



ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ



НАУКА
— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 518, 2024

Точечные мутации в М-домене PCID2 нарушают его функции
в экспорте мРНК у *Drosophila melanogaster*

Ю. А. Вдовина, С. Г. Георгиева, Д. В. Копытова 5

Определение антропогенных загрязнителей в жировой ткани каспийского тюленя
(*Pusa caspica* Gmelin, 1788) методом масс-спектрометрии точных масс

А. А. Шелепчиков, А. Д. Кудрявцева, Е. С. Бродский, Е. Я. Мир-Кадырова,
М. А. Соловьёва, Ф. В. Климов, В. В. Рожно 10

Крупная морская птица (Aves: procellariiformes) в эоцене Западной Сибири

Н. В. Зеленков, М. П. Маслинцына, Т. П. Малышкина, А. А. Масленников,
Е. В. Сыромятникова, Д. О. Гимранов 16

Белок Z4 дрозофилы имеет в своем составе димеризующийся ZAD-домен

А. Н. Бончук, П. Г. Георгиев 21

Пещера Тип-Тугай – первое логово пещерной гиены *Crocota spelaea* (Goldfuss, 1823) на Урале

Д. Р. Хантемиров, А. В. Кочнев, Т. В. Струкова, Д. О. Гимранов, П. А. Косинцев 26

В сообществах с доминированием инвазионного дерева *Acacia negundo*
избирательно снижается встречаемость арбускулярно микоризных трав

Д. В. Веселкин, Д. И. Дубровин, О. С. Рафикова 31

Получение кроликов с нокаутом гена *LEPR* с помощью системы CRISPR/CAS9

Ю. Ю. Силаева, П. Д. Сафонова, Д. В. Попов, М. А. Филатов, Ю. Д. Окулова,
Р. А. Шафеи, О. И. Скобель, Д. Э. Высоцкий, Ю. Д. Губарев, В. И. Глазко,
Т. Т. Глазко, П. Г. Георгиев, Г. Ю. Косовский, М. В. Шепелев 36

Возрастные особенности реакции гомеостаза крыс вистар на холодовой стресс:
закаливание, или дезорганизация?

М. В. Кондашевская, К. А. Артемьева, В. В. Алексанкина,
Е. Б. Манухина, Л. М. Михалева 46

Внутривидовая изменчивость серой крысы (*Rattus norvegicus*) в России
по данным D-loop мтДНК

А. Н. Мальцев, И. В. Картавцева, В. В. Стахеев, В. Ю. Комаров, Ю. А. Баженов,
Л. А. Хляп, Е. В. Котенкова 53

Конформационные изменения биомолекул ДНК
и белка в патогенезе ишемического инсульта

А. В. Трофимов, Т. И. Власова, В. А. Трофимов, Д. И. Сидоров, М. А. Спирина 58

Древнейшая ласточка (Aves: passeriformes: Hirundinidae)
из верхов нижнего миоцена юга Восточной Сибири

Н. В. Волкова 64

Гепард <i>Acinonyx pardinensis</i> (Felidae, Carnivora) из раннего плейстоцена Крыма (пещера Таврида)	
<i>Д. О. Гимранов, Х. Мадурелл-Малапейра, Ц. Цзянцзуо, А. В. Лавров, А. В. Лопатин</i>	70
Состав и содержание жирных кислот в мышечной ткани алтайского османа Потанина <i>Oreoleuciscus potanini</i> (Cypriniformes, Actinopterygii) из водохранилищ Монголии	
<i>Ю. Ю. Дгебуадзе, Н. Н. Сущик, Б. Мэндсайхан (B. Mendsaikhan), Д. Алтансүх (D. Altansukh), А.Ю. Емельянова, М. И. Гладышев</i>	76
Изучение TRPV1-каналов центральной нервной системы и их влияния на тревожное состояние у мышей ICR	
<i>В. М. Павлов, А. Ю. Федотова, Я.А. Андреев, В. А. Паликов, И. А. Дьяченко</i>	81
Исследование с помощью микроядерного теста радиочувствительности и индукции радиационного адаптивного ответа в лимфоцитах периферической крови пациентов с онкологическими заболеваниями	
<i>В. Е. Балакин, О. М. Розанова, Н. С. Стрельникова, Е. Н. Смирнова, Т. А. Белякова</i>	86
Фармакологическая модуляция решения когнитивного теста у мышей разных генотипов	
<i>О. В. Перепелкина, И. И. Полетаева</i>	93
Белок Xmas-2, основной белок комплекса экспорта мРНК TREX-2, не определяет специфичность связывания мРНК gas2 комплексом	
<i>М. М. Куршакова, Ю. А. Вдовина, Г. С. Георгиева, Д. В. Копытова</i>	96
Высокоошибочный синтез ДНК на клик-лигированных матрицах	
<i>А. В. Ендуткин, А. О. Яковлев, Т. Д. Жарков, В. М. Голышев, А. В. Юдкина, Д. О. Жарков</i>	101
Циркадная регуляция экспрессии генов метаболизма каротиноидов (PSY2, LCYE, CRTRB1, NCED1) в листьях томата <i>Solanum lycopersicum</i> L.	
<i>М. А. Филюшин, А. В. Щенникова, Е. З. Кочиева</i>	108

CONTENTS

Vol. 518, 2024

Point mutations in the M-domain of PCID2 impair its function in mRNA export in *Drosophila melanogaster*

Y. A. Vdovina, S. G. Georgieva, D. V. Kopytova..... 5

Determination of anthropogenic pollutants in the adipose tissue of the Caspian seal (*Pusa caspica* Gmelin, 1788) using high-resolution accurate mass-spectrometry

A. A. Shelepchikov, A. D. Kudryavtseva, E. S. Brodsky, E. Ya. Mir-Kadyrova, M. A. Solovyova, F. V. Klimov, V. V. Rozhnov.....10

Large Marine Bird (Aves: Procellariiformes) in the Eocene of Western Siberia

N. V. Zelenkov, M. P. Maslitsyna, T. P. Malyshkina, A. A. Maslennikov, E. V. Syromyatnikova, D. O. Gimranov..... 16

Drosophila protein Z4 has N-terminal ZAD dimerization domain

A. N. Bonchuk, P. G. Georgiev 21

Tip-Tugai cave – the first cave hyena *Crocota spelaea* (Goldfuss, 1823) den in the Urals

D. R. Khantemirov, A. V. Kochnev, T. V. Strukova, D. O. Gimranov, P. A. Kosintsev.....26

In communities dominated by invasive tree *Acer negundo*, the occurrence of arbuscular mycorrhizal herbs is selectively decreased

D. V. Veselkin, D. I. Dubrovin, O. S. Rafikova..... 31

Generation of LEPR K knockout Rabbits with CRISPR/CAS9 System

Y. Y. Silaeva, P. D. Safonova, D. V. Popov, M. A. Filatov, Y. D. Okulova, R. A. Shafey, O. I. Skobel, D. E. Vysotskii, Y. D. Gubarev, V. I. Glazko, T. T. Glazko, P. G. Georgiev, G. Y. Kosovsky, M. V. Shepelev.....36

Age Peculiarities of Homeostasis Response in Wistar Rats to Cold Stress: Hardening or Disorganization?

M. V. Kondashevskaya, K. A. Artemyeva, V. V. Aleksankina, E.B. Manukhina, L. M. Mikhaleva..... 46

Intraspecific Variability of the Norway Rats (*Rattus Norvegicus*) in Russia According to D-Loop mtDNA Data

A. N. Maltsev, I. V. Kartavtseva, V. V. Stakheev, V. Y. Komarov, Y. A. Bazhenov, L. A. Khlyap, E. V. Kotenkova.....53

Conformational changes in DNA and protein biomolecules in the pathogenesis of ischemic stroke

A. V. Trofimov, T. I. Vlasova, V. A. Trofimov, D. I. Sidorov, M. A. Spirina58

The Oldest Swallow (Aves: Passeriformes: Hirundinidae) from the Upper Lower Miocene of the South of Eastern Siberia

N. V. Volkova..... 64

Cheetah *Acinonyx pardinensis* (Felidae, Carnivora) from the Early Pleistocene of Crimea (Taurida cave)

D. O. Gimramov, J. Madurell-Malapeira, Q. Jiangzuo, A. V. Lavrov, A. V. Lopatin 70

Composition and Content of Fatty Acids in Muscle Tissue of the Potanin Altai Osman *Oreoleuciscus Potanini* (Cypriniformes, Actinopterygii) from Mongolian Reservoirs

Yu. Yu. Dgebuadze, N. N. Sushchik, B. Mendsaikhan, D. Altansukh, A. Y. Emelianova, M. I. Gladyshev.....76

The study of TRPV1 channels of the central nervous system and their effect on anxiety in ICR mice

V. M. Pavlov, A. Yu. Fedotova, Y.A. Andreev, V. A. Palikov, I. A. Dyachenko 81

Study Using the Micronuclear Test of Radiosensitivity and Induction Radiation of Adaptive Response in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Oncological Diseases

V. E. Balakin, O. M. Rozanova, N. S. Strelnikova, E. N. Smirnova, T. A. Belyakova.....86

Pharmacological Modulation of Cognitive Test Solution in Mice of Two Genotypes.

O. V. Perepelkina, I. I. Poletaeva.....93

Xmas-2 protein, a core protein of the TREX-2 mRNA export complex, is not determined the specificity of ras2 mRNA binding by the complex

M. M. Kurshakova, Y. A. Vdovina, S. G. Georgieva, D. V. Kopytova 96

Error-prone DNA synthesis on click-ligated templates

A. V. Endutkin, A. O. Yakovlev, V. M. Golyshev, T. D. Zharkov, A. V. Yudkina, D. O. Zharkov..... 101

Circadian Regulation of Expression of Carotenoid Metabolism Genes (PSY2, LCYE, CRTRB1, NCED1) in Leaves of Tomato *Solanum Lycopersicum* L.

M. A. Filyushin, A. V. Shchennikova, E. Z. Kochieva 108

УДК 577.218

ТОЧЕЧНЫЕ МУТАЦИИ В М-ДОМЕНЕ PCID2 НАРУШАЮТ ЕГО ФУНКЦИИ В ЭКСПОРТЕ мРНК У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2024 г. Ю. А. Вдовина, академик РАН С. Г. Георгиева, Д. В. Копытова*

Поступило 15.04.2024 г.

После доработки 03.05.2024 г.

Принято к публикации 07.05.2024 г.

Белок PCID2 входит в состав комплекса TREX-2 эукариот, отвечающего за экспорт мРНК из ядра в цитоплазму. Ранее, мы показали, что PCID2 *D. melanogaster* участвует в специфичном распознавании мРНК и выявили ключевые аминокислоты, отвечающие за взаимодействие с РНК гена *ras2*. В данной работе мы показываем, что точечные мутации данных аминокислот нарушают взаимодействие белка с РНК клетки и экспорт полиА-содержащей мРНК из ядра в цитоплазму в клетках *D. melanogaster*.

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

DOI: 10.31857/S2686738924050013

Ядерная фаза экспрессии генов завершается экспортом зрелых мРНК через ядерные поры в цитоплазму [1]. Комплекс TREX-2 представленный у всех эукариот, отвечает за экспорт мРНК, а также выполняет ряд других биологических функций, включая предотвращение нестабильности генома [2–7]. Кроме того, в почкующихся дрожжах комплекс TREX-2 опосредует локализацию активно экспрессируемых генов, таких как *GAL1*, а у многоклеточных способствует как локализации, так и обеспечению быстрого перемещения к ядерным порам и ядерному экспорту мРНК генов БТШ [4, 7–11]. Нокдаун субъединиц комплекса приводит к перераспределению мРНК, которая в норме локализуется большей частью в цитоплазме, а при нокдауне субъединиц комплекса задерживается в ядре [4, 7, 11]. У *D. melanogaster* комплекс TREX-2 состоит из четырех белков: Xmas-2, PCID2, ENY2 и Sem1p [4, 12, 13].

Недавно было показано, что в специфичном распознавании мРНК в составе комплекса участвует белок PCID2 [14]. PCID2 содержит два домена взаимодействия с мРНК, которые располагаются в М- и С-концевой части белка. Домен, локализованный на С-конце PCID2, специфично

связывает фрагмент 3'-некодирующей области мРНК гена *ras2*. А делеция С-концевой последовательности PCID2 приводит к нарушению экспорта мРНК из ядра в цитоплазму [15]. Был также найден ранее неизвестный домен, находящийся в центральной части белка (М), неспецифично взаимодействующий с мРНК. Точечные мутации в М-доме PCID2 приводили к резкому снижению взаимодействия PCID2 с *ras2* мРНК [14].

В данной работе мы исследовали влияют ли эти мутации в белке на взаимодействие белка с РНК в клетке, а не только в системе *in vitro*. Кроме того, мы предполагали выяснить, влияет ли это на связывание с широким спектром РНК (с которым взаимодействует PCID2). Также была цель изучить влияние данных мутаций на общий экспорт мРНК из ядра в цитоплазму.

Консервативные аминокислоты, отвечающие по нашим результатам за взаимодействие с РНК *ras2*, находятся в положениях Arg191 и Arg216 (Рис. 1а).

Каждая аминокислота была заменена на Ala в мутантных белках (PCID2^{R191A} и PCID2^{R216A}). На рис. 1б представлена предсказанная структура белка PCID2 *D. melanogaster*, на которой отмечены заменяемые аминокислоты. Обе аминокислоты находятся в канавке, участвующей во взаимодействии PCID2 с РНК. Как было показано в предыдущей работе, эти замены приводят к резкому снижению связывания PCID2 с РНК гена *ras2* *in vitro*.

Федеральное государственное учреждение науки
Институт Молекулярной Биологии Российской
академии наук, Москва, Российская Федерация

*e-mail: d_dmitrieva@mail.ru

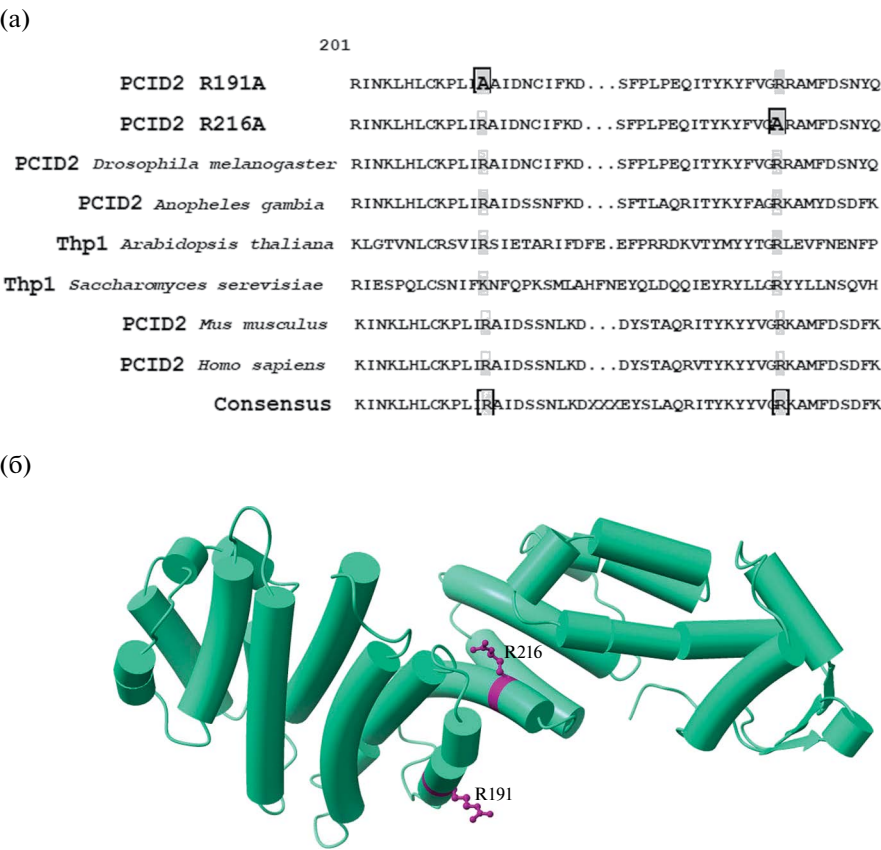


Рис. 1. Предсказанные сайты связывания с РНК на молекуле PCID2. (а) Эволюционное выравнивание последовательности М-домена PCID2 у некоторых видов эукариот. Аминокислоты, замененные в мутантных белках PCID2^{R191A} и PCID2^{R216A}, выделены и обведены в рамку. (б) Предсказанная структура PCID2 *D. melanogaster* из базы данных AlphaFold Protein Structure Database. Аминокислоты в М-доме белка, замененные в мутантных белках PCID2^{R191A} и PCID2^{R216A}, указаны на предсказанной структуре PCID2.

На первом этапе работы было проверено, нарушают ли данные мутации связывание PCID2 с РНК клетки. Для этого культуру клеток S2 растили в среде с добавлением 5-этинилуридина 2 часа [13]. Тотальную РНК, меченную 5-этинилуридином и биотином, выделяли из клеток на колонках со стрептавидин-агарозой [13]. Далее, одинаковое количество меченой РНК, иммобилизованной на стрептавидин-агарозе, инкубировали с лизатами белков PCID2 дикого типа или мутированных форм PCID2^{R191A} и PCID2^{R216A}, наработанными в бактериальной системе (рис. 2а).

В аналогичном эксперименте меченную тотальную РНК инкубировали с экстрактом клеток, трансформированных конструкциями для экспрессии PCID2 дикого типа или мутированных форм PCID2: PCID2^{R191A} и PCID2^{R216A} (рис. 2б). После инкубации материал отмывали от несвязавшегося белка высоко-солевым раствором, содержащим 500 мМ KCl. Ассоциированные с РНК белки детектировали с помощью разделения

в ПААГ и вестерн-блот гибридизации с антителами к PCID2 (рис. 2а, б).

Эксперимент по взаимодействию тотальной РНК клетки с формами PCID2, экспрессированными в бактериях, показал, что белок PCID2 дикого типа, как и мутантные формы, связываются с РНК. Однако, мутантные формы PCID2 хуже осаждались за РНК, что говорит об их худшем связывании. Связывание обоих мутантных белков с новосинтезированной РНК было слабее по сравнению с контролем. Однако мутация R216A приводила к наибольшему ослаблению взаимодействия (рис. 2 а,б), что соответствует результатам, полученным ранее [14]. При инкубации тотальной меченой РНК с ядерными экстрактами клеток, в которых экспрессировали PCID2, PCID2^{R191A} или PCID2^{R216A}, были получены аналогичные результаты (рис. 2 б). Таким образом, можно заключить, что мутации данных аминокислот нарушают связывание PCID2 с РНК в белковом экстракте аналогично тому, как это было показано *in vitro*. Более того, данные мутации нарушают связывание

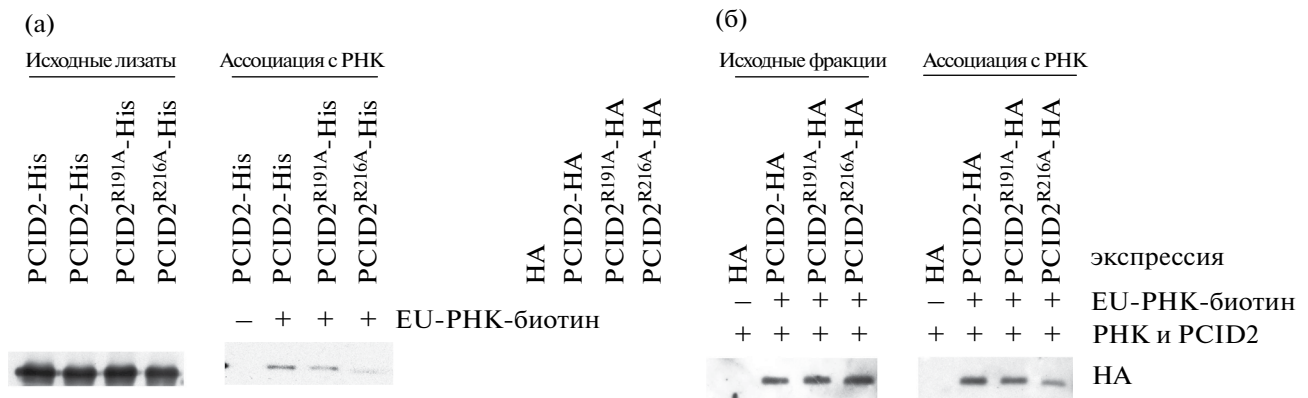


Рис. 2. Нарушение ассоциации PCID2 с точечными мутациями в М-домене с новосинтезированной РНК. Меченую биотином EU-РНК инкубировали с лизатами клеток, содержащих PCID2, или PCID2^{R191A}, или PCID2^{R216A}, экспрессированными в (а) бактериальной системе и (б) в S2 клетках *D. melanogaster*. Меченная биотином EU-РНК со связавшимися белками была иммобилизована на стрептавидин-агарозе. Ассоциированные с РНК белки детектировали вестерн-блот анализом.

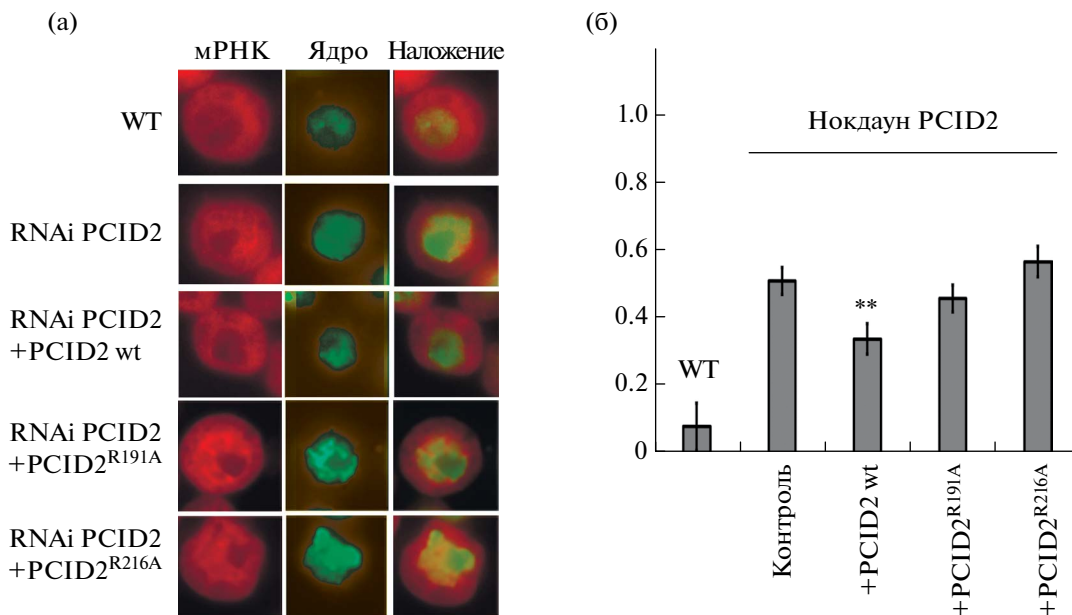


Рис. 3. PCID2 с точечными мутациями в М-домене не способен выполнять свои функции в экспорте мРНК. (а) Распределение мРНК в S2 клетках в контрольных клетках (wt) и при нокдауне PCID2 (контроль). В экспериментах клетки, в которых проводился нокдаун PCID2, были трансфицированы полноразмерным PCID2 или PCID2^{R191A}, или PCID2^{R216A}. Примеры распределения мРНК (красное окрашивание) и клеточных ядер (зеленое окрашивание) и соответствующие слитые изображения показаны для контрольных клеток и клеток после нокдауна PCID2 и трансфекции с PCID2wt, PCID2^{R191A}, PCID2^{R216A} (увеличение, x1000). Для выявления поли(А) РНК проводили РНК FISH с использованием меченного Су3-олиго-dТ праймера. Ядра окрашивали DAPI. Изображения были перекрашены в программе Photoshop для лучшей визуализации. (б) Процент клеток, в которых мРНК оставалась в ядре. На гистограмме представлены результаты эксперимента, описанного на Рисунке 3а. Каждый эксперимент был проведен в четырех повторах. В каждой реплике вслепую подсчитывали около 200 клеток и вычисляли среднее значение. Сравнение между экспериментальными группами проводилось с помощью t-критерия Стьюдента. Все данные представлены как средние $\pm$ SD (столбцы ошибок) не менее чем для четырех независимых экспериментов. Звездочки указывают на то, что данные статистически значимы при *P < 0,05 или **P < 0,01.

с тотальной РНК, а не только для РНК *ras2*, для которой это было показано ранее *in vitro*.

Влияние мутантных белков на экспорт мРНК было изучено на клетках S2 *D. melanogaster*. В клетках был проведен нокдаун эндогенного белка PCID2 методом РНК интерференции. Распределение мРНК в клетке выявлялось с помощью FISH с меченным Су3-oligo-dT праймером [4]. В контрольных клетках основная часть мРНК выявлялась в цитоплазме (рис. 3а), в то время как при нокдауне PCID2 мРНК перераспределялась, концентрируясь в ядре и вокруг ядра в цитоплазме, демонстрируя паттерн распределения, показанный ранее [12].

Чтобы понять, влияют ли исследуемые мутации PCID2 на экспорт мРНК, в клетках с нокдауном эндогенного PCID2 были экспрессированы полно-размерный PCID2 дикого типа, мутантный белок PCID2^{R191A} или мутантный белок PCID2^{R216A}, сли-тые с НА-эпитопом.

При нокдауне PCID2 51% клеток имеют нарушения в экспорте мРНК (рис. 3б). При экспрессии в клетках с нокдауном эндогенного PCID2 рекомбинантного PCID2, количество клеток с нарушениями уменьшалось до 34%, что указывает на его способность восстанавливать экспорт мРНК. Наоборот, экспрессия мутантного белка PCID2^{R191A} только незначительно восстанавливала экспорт мРНК: количество клеток с нарушениями уменьшалось до 46%. При экспрессии белка PCID2^{R216A} количество клеток с нарушениями даже незначительно увеличивалось (до 57%), сами же клетки теряли свою округлую форму (рис. 3а, б). Эти эксперименты показывают, что мутантные формы PCID2, R191A и R216A, не способны заменить эндогенный PCID2 в ядерном экспорте мРНК.

Таким образом, роль аминокислот Arg191 и Arg216 М-домена PCID2 во взаимодействии с *ras2* мРНК, показанная ранее в системе *in vitro*, подтвердилась на экспериментах, проведенных в клетке на полиА-содержащей мРНК. Более того, нарушение этого взаимодействия приводит к нарушению экспорта мРНК в ядре. Данные результаты показывают, что правильное взаимодействие М-домена PCID2 с молекулой РНК, необходимо для работы всего комплекса экспорта мРНК TREX-2.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП ИМБ РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Данная статья не содержит исследований с участием животных или людей, проведенных кем-либо из авторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kramer S.* Nuclear mRNA maturation and mRNA export control: from trypanosomes to opisthokonts. // *Parasitology*. England, 2021. Vol. 148, № 10. P. 1196–1218.
2. *Wilmes G.M. et al.* A genetic interaction map of RNA-processing factors reveals links between Sem1/Dss1-containing complexes and mRNA export and splicing. // *Molecular cell*. United States, 2008. Vol. 32, № 5. P. 735–746.
3. *Santos-Pereira J.M. et al.* A genome-wide function of THSC/TREX-2 at active genes prevents transcription-replication collisions. // *Nucleic acids research*. England, 2014. Vol. 42, № 19. P. 12000–12014.
4. *Kurshakova M.M. et al.* SAGA and a novel Drosophila export complex anchor efficient transcription and mRNA export to NPC // *EMBO Journal*. 2007. Vol. 26, № 24.
5. *Lu Q. 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. Vol. 61, № 2. P. 259–270.
6. *Fischer T. 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. Vol. 21, № 21. P. 5843–5852.
7. *Rodríguez-Navarro S. et al.* Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. // *Cell*. United States, 2004. Vol. 116, № 1. P. 75–86.
8. *Chekanova J.A. et al.* Sus1, Sac3, and Thp1 mediate post-transcriptional tethering of active genes to the nuclear rim as well as to non-nascent mRNP. // *RNA* (New York, NY). 2008. Vol. 14, № 1. P. 66–77.
9. *Ellisdon A.M. 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. Vol. 19, № 3. P. 328–336.
10. *Fischer T. et al.* Yeast centrin Cdc31 is linked to the nuclear mRNA export machinery. // *Nature cell biology*. England, 2004. Vol. 6, № 9. P. 840–848.
11. *Jani D. 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. Vol. 40, № 10. P. 4562–4573.
12. *Glukhova A.A. 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. Vol. 18, № 11. P. 1969–1980.
13. *Kopytova D. 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. Vol. 44, № 10.
14. *Vdovina Y.A. et al.* PCID2 Subunit of the *Drosophila* TREX-2 Complex Has Two RNA-Binding Regions. // *Current issues in molecular biology*. Switzerland, 2023. Vol. 45, № 7. P. 5662–5676.
15. *Vdovina Y.A., Georgieva S.G., Kopytova D.V.* 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*. // *Doklady Biochemistry and biophysics*. United States, 2023. Vol. 513, № 1. P. 328–331.

POINT MUTATIONS IN THE M-DOMAIN OF PCID2 IMPAIR ITS FUNCTION IN MRNA EXPORT IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Y. A. Vdovina, Academician of the RAS S. G. Georgieva, D. V. Kopytova[#]

Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

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

PCID2 protein is a component of the eukaryotic TREX-2 complex responsible for mRNA export from the nucleus to the cytoplasm. Previously, we showed that PCID2 of *D. melanogaster* is involved in specific mRNA recognition and identified key amino acids responsible for interaction with the RNA of the *ras2* gene. In this work, we show that point mutations of these amino acids disrupt the interaction of the protein with cellular RNA and the export of polyA-containing mRNA from the nucleus to the cytoplasm in *Drosophila* cells.

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

УДК 543.51; 504.054; 569.745

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТРОПОГЕННЫХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ В ЖИРОВОЙ ТКАНИ КАСПИЙСКОГО ТЮЛЕНЯ (*PUSA CASPICA* GMELIN, 1788) МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ТОЧНЫХ МАСС

© 2024 г. А. А. Шелепчиков^{1, 2}, А. Д. Кудрявцева¹, Е. С. Бродский¹,
Е. Я. Мир-Кадырова¹, М. А. Соловьева¹, Ф. В. Климов³, академик РАН В. В. Рожнов¹

Поступило 17.04.2024 г.

После доработки 02.05.2024 г.

Принято к публикации 05.05.2024 г.

Показана возможность комплексной характеристики загрязнения тканей живых организмов стойкими органическими загрязнителями в процессе одного анализа путем сочетания ГХ и масс-спектрометрии точных масс. Изучены образцы жировой ткани двух каспийских тюленей (*Pusa caspica* Gmelin, 1788), найденных в 2020 г. мертвыми на берегу Каспийского моря. Основными загрязнителями каспийского тюленя являются хлорорганические пестициды, в первую очередь, ДДТ и ГХЦГ, а также ПХБ. Распределение метаболитов свидетельствует об отсутствии недавнего применения пестицидов. Содержание ПХБ сравнительно велико, но, как и для пестицидов, находится на нижней границе диапазона величин, определявшихся ранее. Хлорданы, полихлорированные нафталины и полибромдифениловые эфиры обнаружены в количествах, не позволяющих считать их основными загрязнителями каспийского тюленя. Содержание загрязнителей находится ниже значений, при которых можно ожидать явное влияние на состояние здоровья тюленей. Метод масс-спектрометрии точных масс показал себя удобным инструментом для выполнения одновременно как целевого, так и обзорного анализа широкого круга органических загрязнителей в процессе одного эксперимента.

Ключевые слова: каспийский тюлень, *Pusa caspica*, органические загрязнители, ГХ/МС, масс-спектрометрия точных масс

DOI: 10.31857/S2686738924050028

Накопление антропогенных загрязнителей в крупных внутренних водоемах создает проблемы для рыболовства и представляет угрозу местным видам диких животных. Наиболее известны проблемы загрязнения Балтийского моря, окруженного промышленно развитыми европейскими странами, но эта проблема не менее актуальна и для Каспийского моря [1, 2]. Основным источником загрязнения внутренних водоемов являются стоки прибрежных городов и предприятий, исторически имевшие

малую степень очистки, а также впадающие реки. В Каспийское море впадает Волга — одна из крупнейших рек на Земле, бассейн которой занимает треть европейской части России, на берегах которой располагалось множество промышленных предприятий, включая заводы Химпрома, производившие обширный перечень опасных веществ [3]. Кроме того, каспийский бассейн является важным нефтегазовым регионом с неизбежными экологическими проблемами [4].

Обитающий в Каспийском море единственный вид млекопитающих, каспийский тюлень (*Pusa caspica* Gmelin, 1788), является его эндемиком. В холодное время года он концентрируется в северной части моря, где на льду приносит потомство, а в безледный период совершает миграции по всему Каспию. Этот вид является конечным звеном многих пищевых цепей экосистем Каспийского моря. На численность тюленей влияют разные факторы, в том числе эпидемии и выделяющиеся в результате естественных сейсмических процессов

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

²Всероссийский государственный центр качества
и стандартизации лекарственных средств для животных
и кормов (ВГНКИ), Москва, Россия

³Казахстанское Агентство Прикладной Экологии (ТОО
«КАПЭ»), Алма-Ата, Казахстан

E-mail: rozhnov-v-2015@yandex.ru

E-mail: efbr@mail.ru

ядовитые газы [5–7], но, очевидно, хозяйственная деятельность человека, ведущая к загрязнению окружающей среды, не может не быть дополнительным фактором риска. Поэтому мониторинг загрязнения необходим для сохранения популяции диких животных и выявления причин их гибели. При этом необходимо понимать, что только сравнительно небольшая часть органических загрязнителей способна накапливаться в живых организмах, передаваясь по пищевым цепям, остальные достаточно быстро метаболизируют или выводятся из организма, присутствуя в некой квазиравновесной концентрации при хронической экспозиции.

Обычно при мониторинге или обследовании территории целью является определение набора известных, наиболее вероятных или выявленных при предварительном исследовании загрязнителей, а также обнаружение новых. Это прежде всего стойкие органические загрязнители (СОЗ) – соединения, устойчивые к разложению и способные накапливаться в организме. К ним относятся хлорорганические пестициды, ПХДД/Ф, ПХБ и др. Основными загрязнителями тканей каспийских тюленей, помимо нефтепродуктов, являются ДДТ, ГХЦГ, ПХБ, обнаруживались также и другие пестициды из числа стойких органических загрязнителей, а также ГХБ и хлорнафталины [1, 8–10]. Поскольку целевые вещества имеют разную природу, разные концентрации и разные сигналы отклика, для их определения, как правило, требуется применение нескольких различных способов пробоподготовки, методов и режимов анализа. Однако при этом значительно больший массив веществ может оставаться вне поля зрения из-за недостаточной чувствительности и селективности методов ГХ/МС обзорного анализа с регистрацией полного масс-спектра. Обзорный анализ для обнаружения нецелевых или неизвестных веществ обычно выполняется путем интерпретации масс-спектров разделенных хроматографических пиков методами библиотечного поиска, или экспертного анализа, или построением селективных масс-хроматограмм по отдельным ионам или группам специфичных ионов [11].

В настоящее время с развитием приборостроения и возможностью реализации в рутинном анализе высокоселективных методов, таких как масс-спектрометрия высокого разрешения (МСВР), тандемная масс-спектрометрия (МС/МС), позволяющих выделять из сложных смесей большой набор индивидуальных компонентов, появилась возможность как резкого увеличения числа одновременно определяемых заданных веществ, так и проведения обзорного анализа для поиска нецелевых или неизвестных соединений. Эти новые возможности позволяют, во-первых, одновременно определять большое число компонентов, во-вторых, совместить такие разные методы анализа

как целевой и обзорный, в-третьих, обеспечить высокую чувствительность, необходимую для определения некоторых компонентов, в частности, СОЗ. Высокое разрешение снимает ограничения на наличие различных веществ – аналитов и стандартов – с одной и той же номинальной массой [12]. Высокая чувствительность позволяет значительно уменьшить навеску пробы, при этом сокращается как количество растворителей, так и количество балластных и мешающих соединений, инжестируемых в колонку.

Одним из наиболее подходящих приборов для такого анализа является сочетание ГХ с орбитальной ионной ловушкой Orbitrap. Этот прибор обладает выдающимися аналитическими характеристиками: возможность сканирования полного масс-спектра в широком интервале массовых чисел при сверхвысоком разрешении (100 000–1 000 000), высокой чувствительности, относительно широком динамическом диапазоне (до 4 порядков) и высокой точности измерения масс ионов (1–10 ppm). Метод анализа сложных смесей на этом приборе, когда каждому иону на основании точно измеренной массы может быть поставлена в соответствие одна эмпирическая формула, получил название HRAM (High Resolution Accurate Mass – масс-спектрометрия точных масс) [13]. Применение такого прибора для анализа антропогенных загрязнителей позволяет в одном опыте определять большой набор целевых соединений – пестицидов, хлорорганических соединений, таких как ПХБ, полихлорнафталины, хлорбензолы, хлорфенолы, а также ПАУ, пластификаторов и др., а также осуществлять обзорный анализ по селективным ионным масс-хроматограммам по точным массам ионов и дефектам масс.

Это многообещающий метод мониторинга загрязнений на высших ступенях трофической цепи, когда требуется оценить присутствие разнообразных, не всегда известных заранее органических загрязнителей разной природы в широком интервале концентраций.

Таким образом, цель работы – показать возможность наиболее полной комплексной характеристики загрязнения тканей живых организмов органическими загрязнителями на примере жировой ткани каспийского тюленя в процессе одного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Место сбора материала. В данной работе мы изучили образцы жировой ткани двух каспийских тюленей (*Pusa capsica* Gmelin, 1788), найденных мертвыми на берегу Каспийского моря: образец PC.PR-11/20-15D (SF-1) – найден 10.11.2020 на участке побережья между п. Форт-Шевченко

и п. Баутино (Республика Казахстан) и образец РС.MZ-10/20-01D (SF-2), найденный 11.04.2020 на о. Малый Жемчужный (Российская Федерация),

Аналитическая часть. К пробе около 0.5 г жировой ткани добавляли смесь ^{13}C изотопномеченных внутренних стандартов (ES-5465-A-5X, Cambridge Isotop Laboratories), содержащих расширенный набор пестицидов из числа СОЗ, а также дейтерированные стандарты: D_6 -дихлорвос, D_{14} -трифлуралин, D_{10} -диазинон, D_{10} -малатион, D_{10} -паратион и D_5 -пентадиметанталлин, и экстрагировали интенсивным встряхиванием с 8 мл ацетонитрила с добавлением 1 г смеси безводного сульфата магния и ацетата натрия (4:1) в герметичном флаконе вместимостью 12 мл в течение 30 мин. Полученную смесь центрифугировали при 2000 об/мин, экстракт отделяли и упаривали до суха на ротаторном испарителе. Затем растворяли в 0.5 мл гексана и очищали на картридже SupelcleanTM EZ-POP NP (Supelco), для чего сорбент кондиционировали 10 мл ацетона, удаляли ацетон воздухом, наносили пробу, дав ей полностью впитаться, и элюировали 15 мл ацетонитрила. Очищенный экстракт концентрировали до ~20 мкл и анализировали на хромато-масс-спектрометре Thermo Q Exactive GC, диапазон регистрируемых масс 100–520, номинальное разрешение 120 000. Хроматографическое разделение проводили на колонке SGE HT-8 (25 м x 0.25 мм x 0.25 мкм). Температура инжектора 240 °С, ввод пробы в режиме без деления потока с началом продувки через 1 мин. Начальная температура термостата 100 °С, выдержка при этой температуре 1.5 мин, нагрев со скоростью 10 °С/мин до 140 °С, затем 5 °С/мин до 260 °С и 15 °С/мин до 280 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения хлорорганических пестицидов представлены в табл. 1.

Программа обработки данных предусматривала определение по временам удерживания и характеристическим ионам стойких хлорорганических загрязнителей (СОЗ) из перечня Стокгольмской конвенции (ПХДД/ПХДФ, ПХБ, ДДТ, ГХЦГ и др.). Кроме того, производился целевой поиск по временам удерживания и характеристическим ионам ряда пестицидов и инсектицидов, не входящих в группу СОЗ: 2,4-динитротолуола, 2,6-динитротолуола, N,N-диэтилметилбензамида, алахлора, аметрина, ацетохлора, вернолата, гексахлорциклопентадиена, ионола, мевинфоса, метилпаратиона, прометрина, проризамида, тебутиурона, тетбутрина, тетрачлорвинфоса, триади-мефона, трибуфоса, фосфамидона, хлорбензилата, хлорпирифоса, хлорпрофама, хлорфенвинфоса, этридиазола и этхопрофоса.

Из перечисленных соединений были обнаружены следы ионола и хлорбензилата. Для обнаружения пестицидов типа «дринов» рассматривались масс-хроматограммы по характеристическим осколочным ионам m/z 236.8413, 238.8384 [11] (рис. 1). Масс-хроматограммы по этим ионам позволяют обнаружить и идентифицировать все соединения этой группы, содержание каждого из них затем определяется по масс-хроматограммам по наиболее представительным ионам в масс-спектрах.

Кроме указанных в табл. 1 веществ были найдены также полихлорированные бифенилы (ПХБ), два изомера трихлорбензола в соотношении 5:1, характерном для промышленных смесей ПХБ типа «Совтол», тетрабромбифениловый эфир (предположительно ТБДЭ-49) и три метоксизамещенных ТБДЭ, а также в одном из образцов следы трис(4-хлорфенил)метана.

Таблица 1. Концентрация пестицидов в жировой ткани каспийского тюленя (нг/г)

Пестициды	SF1	SF2
α -ГХЦГ	0.6	1.9
β -ГХЦГ	198	272
γ -ГХЦГ	<п.о.	<п.о.
δ -ГХЦГ	0.7	0.3
Пентахлорбензол	0.6	1.5
Гексахлорбензол (ГХБ)	4.2	6.0
о,п'-ДДЭ	<п.о.	<п.о.
п,п'-ДДЭ	1055	1007
о,п'-ДДД	<п.о.	<п.о.
п,п'-ДДД	<п.о.	<п.о.
о,п'-ДДТ	17.1	26.2
п,п'-ДДТ	88.7	112
Алдрин	<п.о.	<п.о.
Дилдрин	42.7	43.8
Изодрин	<п.о.	0.1
Эндрин	0.2	0.2
Гептахлор	<п.о.	<п.о.
Гептахлор эпоксид	7.7	8.4
транс-Хлордан	<п.о.	<п.о.
цис-Хлордан	1.4	1.1
Оксихлордан	14.0	17.0
транс-Нонахлор	21.8	12.2
цис-Нонахлор	3.7	1.7
Эндосульфат-I	<п.о.	<п.о.
Эндосульфат -II	<п.о.	<п.о.
Эндосульфат сульфат	<п.о.	<п.о.
Мирекс	0.8	0.6
Трис(4-хлорфенил)метан	0.01	<п.о.
Трис(4-хлорфенил)метанол	<п.о.	<п.о.

Примечание: п.о. — предел обнаружения

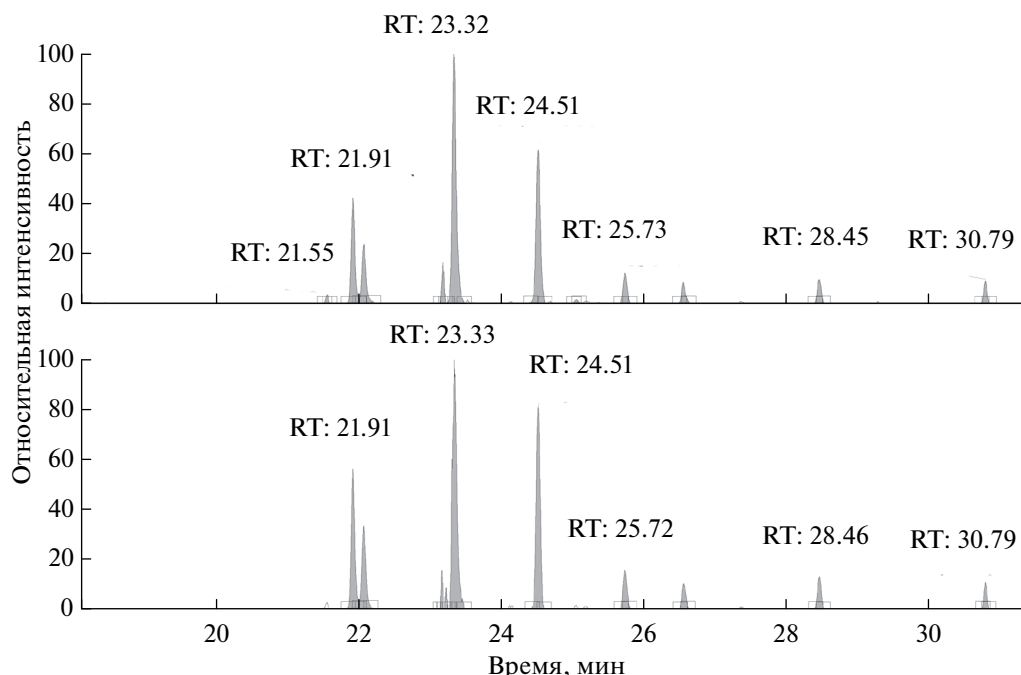


Рис. 1. Масс-хроматограммы «дринов» в жировой ткани тюленя SF-1 по ионам 236.84076 и 238.83781. RT — время удерживания.

Гидроксид- и метоксидметаболиты ПХБ в пробах не обнаружены. Не обнаружены также полихлорированные дибензо-*p*-диоксины и дибензофураны, хлорнафталины.

В целом, наблюдаемая картина характерна для хронической, вероятно, пищевой экспозиции. В каждой группе пестицидов доминируют соединения, являющиеся либо метаболитами, либо бионакапливаемой составляющей в исходном препарате. Так, из ДДТ/ДДД/ДДЭ, основных загрязнителей из группы пестицидов с суммарной концентрацией 1.5 и 1.1 мкг/г (рис. 2), основной вклад дает *p,p'*-ДДЭ (1.05 и 1.01 мкг/г), являющийся метаболитом *p,p'*-ДДТ, концентрация которого на порядок ниже (0.09 и 0.11 мкг/г). Доля *p,p'*-ДДЭ больше 0.6 свидетельствует об отсутствии недавнего применения ДДТ [14].

Ранее в тканях тюленей обнаруживались более высокие уровни ДДТ и метаболитов с более высоким вкладом *p,p'*-ДДТ. Так, в 1993 г. суммарное содержание ДДТ и метаболитов в каспийском тюлене составляло от 5.6 до 88 мкг/г при относительном содержании *p,p'*-ДДТ 25% [8], в 1996 г. — от 5.2 до 670 мкг/г липидов при вкладе ДДТ 8–27% [1], в 1998 и 1999 гг. — 0.78–43 мкг/г и 6.3–470 мкг/г липидов, соответственно, вклад ДДТ не превышал 20% [9]. По результатам исследований 2004–2006 гг. содержание ДДТ в печени и подкожном жире составляло 12.4 мкг/г и 19.9 мкг/г соответственно [4].

ДДТ обладает действием, подобным половому гормону 17 β -эстрадиолу. Наибольшую активность

имеет *o,p'*-ДДТ, фактически отсутствующий в пищевых цепях. В экспериментах на лабораторных животных уровни экспозиции, вызывающие значимый эффект на репродуктивную систему, составляли десятки мг/кг в день. Таким образом, нет прямых оснований считать, что эти вещества могли быть причиной гибели каспийских тюленей.

Второй по содержанию группой пестицидов после ДДТ является ГХЦГ. Суммарное содержание четырех его основных изомеров составляет 0.20 и 0.27 мкг/г, среди них преобладает β -изомер (> 99%), вклад α -ГХЦГ и δ -ГХЦГ составляет 0.3–0.7 и 0.1–0.4% соответственно, γ -изомер фактически отсутствует, что является типичным

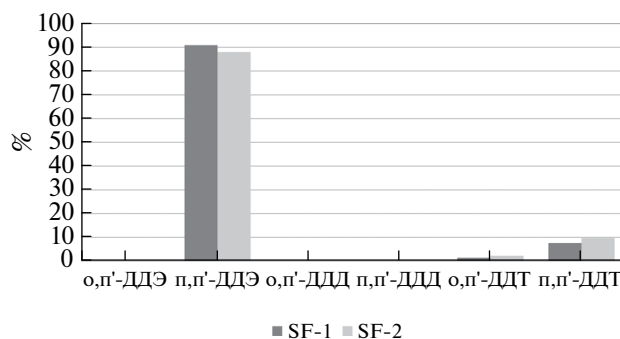


Рис. 2. Профиль соединений группы ДДТ в жире каспийского тюленя (% от суммарной концентрации группы).

распределением для биологических проб в силу того, что наиболее токсичный γ -изомер ГХЦГ быстро метаболизирует и выводится, а β -изомер имеет наибольший коэффициент бионакопления. Однако в литературе имеется упоминание о парадоксальном профиле ГХЦГ в тюленях на северо-западном атлантическом побережье США, где доля α -ГХЦГ достигала 80% от суммы всех изомеров [15]. Ранее сообщалось, что содержание ГХЦГ в тканях каспийского тюленя в 1993 г. составляло 1.0–1.3 мкг/г [8], в 1998 г. – 0.11–2.5 мкг/г ГХЦГ в жировой ткани, в 2000 г. – 0.69–9.9 мкг/г липидов [9], в 2004–2006 гг. – 0.74 и 0.94 мкг/г липидов [4].

Гексахлорбензол (ГХБ) содержится в количестве 4.3 и 5.9 нг/г. Обнаруживавшиеся ранее концентрации ГХБ составляли в 1993 г. 2.4–77 нг/г липидов [8], в 1998 г. 1.9–18 нг/г липидов и в 2000 г. 3.8–160 нг/г липидов [9].

Прочие пестициды из числа СОЗ представлены в виде метаболитов и бионакапливаемых примесей в агрохимикатах. Наибольшую концентрацию в исследованных пробах имеет дилдрин (метаболит алдрина), в меньших концентрациях присутствуют оксихлордан и транс-нонахлор (являющиеся метаболитом и примесью в хлордане) и гептахлорэпоксид (метаболит гептахлора). Все эти соединения эффективно передаются по пищевым цепям и часто обнаруживаются в биологических пробах, несмотря на то, что производство соответствующих препаратов давно запрещено. В бывшем СССР эти пестициды не получили широкого распространения, хотя, вероятно, имело место производство и применение опытных партий. Можно предположить, что они попадали в Каспийское море из других стран.

Суммарное содержание циклодиеновых пестицидов составило 84.6 и 91.6 нг/г. В 1998 г. оно составляло 65–1030 нг/г, в 2000 г. – 21–14000 нг/г липидов [9]. В частности, содержание гептахлорэпоксида было 0.5–170 нг/г липидов в 1998 г. и 63–2600 мкг/г липидов в 2000 г. [9]. Таким образом, как и в случае других обнаруженных загрязняющих веществ, можно говорить о постепенном снижении уровней экспозиции.

Суммарное содержание ПХБ в исследованных пробах составило 0.12–0.16 мкг/г липидов, что значительно меньше найденных ранее значений – 1.1–25.6 мкг/г липидов в 1996 г. [1], 0.95–28 мкг/г липидов в 1998 г. и 2.4–320 мкг/г липидов в 2000 г. [9]. ПХБ имеют распределение конгенеров, характерное для хронической экспозиции млекопитающих: по сравнению с исходным Совтолом наблюдается некоторый сдвиг в более тяжелую область (рис. 3).

Таким образом, метод масс-спектрометрии точных масс показал себя удобным инструментом для выполнения одновременно как целевого, так и обзорного анализа широкого круга органических загрязнителей в процессе одного эксперимента. Основными загрязнителями каспийского тюленя,

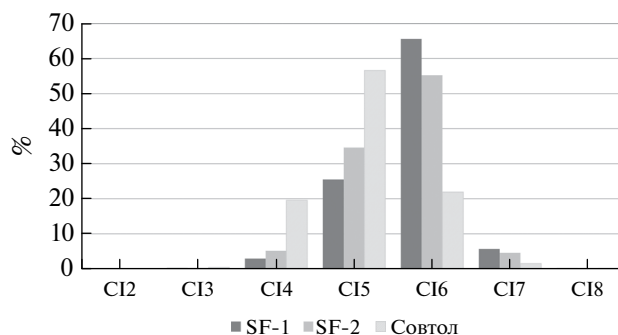


Рис. 3. Распределение ПХБ по степеням хлорирования в образцах жировой ткани тюленя и Совтоле.

как отмечалось и в более ранних исследованиях, являются хлорорганические пестициды, в первую очередь, ДДТ и ГХЦГ, а также ПХБ. Распределение метаболитов свидетельствует об отсутствии недавнего применения пестицидов. Содержание ПХБ сравнительно велико, но, как и для пестицидов, находится на нижней границе диапазона величин, определявшихся ранее. Хлорданы, полихлорированные нафталины и полибромдифениловые эфиры обнаружены в количествах, не позволяющих считать их основными загрязнителями каспийского тюленя. Содержание загрязнителей находится ниже значений, при которых можно ожидать явное влияние на состояние здоровья тюленей.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках «Программы исследований каспийского тюленя в акватории Северного Каспия (2019-2023 гг.)» при финансовой поддержке North Caspian Operating Company N.V. и Казахстанского агентства прикладной экологии (ТОО «КАПЭ»). Авторы благодарят руководство вышеуказанных компаний.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Использованы ткани погибших животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

У авторов нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hall A.J., Duck C.D., Law R.J., et al. // Environmental Pollution. 1999. V. 106. No. 2. P. 203–212.

2. *Abbasian H.* // J. Ecol. Nat. Environ. 2012. V. 4. No. 9. P. 241–246.
3. *Revich B., Shelepchikov A.* // The Fate of Persistent Organic Pollutants in the Environment. Dordrecht: Springer Netherlands. 2008, P. 113–126.
4. Мониторинг окружающей природной среды Северо-Восточной части Каспийского моря при освоении нефтяных месторождений (Результаты экологических исследований Аджип ККО 1993–2006 гг.). Алматы, 2014. 264 с.
5. *Сидоров Л.К., Бизиков В.А., Рожнов В.В., и др.* // Труды ВНИРО. 2023. Т. 193. С. 82–100. <https://doi.org/10.36038/2307-3497-2023-193-82-100>.
6. *Рожнов В.В., Бизиков В.А., Магомедов М.-П.Д., и др.* // Труды ВНИРО. 2022. Т. 187. С. 87–109. <https://doi.org/10.36038/2307-3497-2022-187-87-109>.
7. *Kennedy S., Kuiken T., Jepson P.D., et al.* // Emerg. Infect. Dis. 2000. V. 6. No. 6. P. 637–639.
8. *Watanabe M., Tanabe S., Tatsukawa R., et al.* // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1999. V. 37. No. 3. P. 396–407.
9. *Kajiwara N., Niimi S., Watanabe M., et al.* // Environ. Pollut. 2002. V. 117. No. 3. P. 391–402.
10. *Kajiwara N. Watanabe M., Wilson S., et al.* // Environ. Pollut. 2008. V. 152. No. 2. P. 431–442.
11. *Шелепчиков А.А., Бродский Е.С.* // Масс-спектрометрия. 2014. Т. 11(1). С. 13–21.
12. *Шелепчиков А.А., Бродский Е.С., Жильников В.Г., и др.* // Масс-спектрометрия. 2008. Т. 5 (4). С. 245–258.
13. *Crutchfield C.A., Clarke W.* // Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory. Chapter 12. 2017. P. 247–259. doi.org/10.1016/B978-0-12-800871-3.00012-2.
14. *Aguilar A.* // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 1984. V. 41(6). P. 840–844. <https://doi.org/10.1139/f84-100>.
15. *Shaw S.D., Brenner D., Bourakovsky A., et al.* // Mar. Pollut. Bull. 2005. V. 50. No. 10. P. 1069–1084.

DETERMINATION OF ANTHROPOGENIC POLLUTANTS IN THE ADIPOSE TISSUE OF THE CASPIAN SEAL (*PUSA CASPICA* GMELIN, 1788) USING HIGH-RESOLUTION ACCURATE MASS SPECTROMETRY

**A. A. Shelepchikov^{1, 2}, A. D. Kudryavtseva¹, E. S. Brodsky¹,
E. Ya. Mir-Kadyrova¹, M. A. Solovyova¹, F. V. Klimov³,
Academician of the RAS V. V. Rozhnov¹**

¹*A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

²*The All-Russian State Center for Quality and Standardization of Veterinary Drugs and Feed, Moscow, Russian Federation*

³*Kazakhstan Agency of Applied Ecology, Almaty, Kazakhstan*

e-mail: rozhnov-v-2015@yandex.ru

The possibility of comprehensive characterization of tissue contamination of living organisms by organic pollutants in the course of a single analysis by combining GC and high resolution accurate mass-spectrometry has been demonstrated. Samples of adipose tissue from two Caspian seals (*Pusa caspica* Gmelin, 1788), found dead in 2020 on the shores of the Caspian Sea, were studied. The main pollutants of the Caspian seal are organochlorine pesticides, primarily DDT and HCH, as well as PCBs. The distribution of metabolites indicates the absence of recent pesticide use. The PCB content is relatively high, but, as for pesticides, is at the lower limit of the range of values previously determined. Chlordanes, polychlorinated naphthalenes and polybrominated diphenyl ethers were not detected in quantities that would allow them to be considered the main pollutants of the Caspian seal. Contaminant levels are below levels at which a clear effect on seal health can be expected. High-resolution accurate mass spectrometry has proven to be a convenient tool for performing both target and non-target analysis of a wide range of organic pollutants in one experiment.

Keywords: Caspian seal, *Pusa capsica*, organic pollutants, analytical methods, high-resolution accurate mass-spectrometry

УДК 551.781.4:568.23:598.234

КРУПНАЯ МОРСКАЯ ПТИЦА (AVES: PROCELLARIIFORMES) В ЭОЦЕНЕ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

© 2024 г. Н. В. Зеленков¹*, М. П. Маслинцына², Т. П. Малышкина³,
А. А. Масленников⁴, Е. В. Сыромятникова¹, Д. О. Гимранов⁵

Представлено академиком РАН А.В. Лопатиным

Поступило 11.04.2024 г.

После доработки 20.05.2024 г.

Принято к публикации 21.05.2024 г.

В статье описана первая находка птицы из палеогена Сибири. Фрагмент тибиятарсуса из эоцена тавдинской свиты Тюменской области (Западная Сибирь) отнесен к трубконосым (Procellariiformes indet.). Описываемая птица морфологически ближе к буревестниковым (Procellariidae), но по размерам сопоставима с альбатросами (Diomedidae) и, по-видимому, представляет стволовых представителей этого семейства. Находка впервые указывает, что стволовые альбатросы или сходные с ними крупные Procellariiformes могли иметь всесветное распространение уже в эоцене.

Ключевые слова: ископаемые птицы, эоцен, Западная Сибирь, тавдинская свита, Кыштырлинский карьер

DOI: 10.31857/S2686738924050037

Разнообразие и эволюция птиц в палеогене известны очень неравномерно [1]. С территории Сибири ископаемых остатков палеогеновых птиц до настоящего времени описано не было [2], в связи с чем весь раннекайнозойский этап эволюции авифауны Северной Азии остается неизученным. В 2014 г. в эоценовом местонахождении морской фауны Кыштырлинский карьер в окрестностях Тюмени (Тюменская область, юг Западной Сибири; 56°55'07 N, 65°48'59 E) был обнаружен тибиятарсус крупной птицы из отряда трубконосых (Procellariiformes), описанию которого посвящена данная работа. Эта первая находка палеогеновых птиц в Сибири и одна из немногих находок трубконосых доолигоценного возраста во всем мире [1]. Изученный материал хранится

в Палеонтологическом институте им. А.А. Борисяка РАН (ПИН). Томографирование выполнено на рентгеновском микротомографе Neoscan N80 в ПИН.

Палеогеновые отложения в Кыштырлинском карьере представлены тавдинской свитой, широко распространенной на юге Западной Сибири (рис. 1). Тавдинская свита формировалась в течение лютеца–приабона в условиях эпиконтинентального морского бассейна, утратившего связь с Арктикой, но еще соединявшегося с Туранским морем через Тургайский пролив [3, 4]. Точные возрастные границы свиты остаются дискуссионными [3, 4]. Состав фауны моллюсков Кыштырлинского карьера местонахождения указывает на формирование тафоценоза в условиях мелкого моря и возможную опресненность поверхностного слоя, сопоставимую с современным Азовским морем [5]. Фауна акул также подтверждает формирование местонахождения в условиях открытого мелкого моря [6]. Описываемая кость птицы происходит из верхней ступени карьера — обогащенного конкрециями слоя голубовато-серых и зеленовато-серых глин мощностью 8 м, содержащего раковины моллюсков, кости костистых рыб, зубы акул и углефицированную древесину [7].

Дистальный фрагмент правого тибиятарсуса (экз. ПИН, № 2612/6) крупной трубконосой птицы (Procellariiformes indet.) сохранился частично:

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

²Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

³Институт геологии и геохимии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

⁴ОВАТЭК НТЦ, Тюмень, Россия

⁵Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, Россия

*e-mail: nzelen@paleo.ru



Рис. 1. Месторасположение Кыштырлинского карьера на карте Западной Сибири.

латеральный и медиальный мышелки разрушены, разгибательная борозда выражена неявно, блоковые гребни утрачены. Значительная часть поверхности кости эродирована. Общая длина фрагмента — 36 мм, дистальная ширина — 14 мм. По абсолютным размерам описываемый экземпляр соответствует современному чернобровому альбатросу (*Thalassarche melanophrys*).

Несмотря на неполную сохранность, общее устройство дистальной части тибиотарсуса у экз. ПИН, № 2612/6 диагностично. Характерной морфологической особенностью описываемого экземпляра является практически невыраженная медиальная расширенность дистального эпифиза относительно стержня наряду с широкой *incisura intercondylaris* — такое строение характеризует птиц из отрядов Procellariiformes, Gaviiformes, Ciconiiformes и Ardeiformes — близких родственников в современной фауне, принадлежащих кладе Aqueornithes. При этом наибольшее сходство в геометрии дистальной части стержня прослеживается с Procellariiformes и, в частности, с буревестниковыми (Procellariidae). Так, при виде с краниальной стороны характерен наклон дистального края *incisura intercondylaris* латерально, а также отчетливый перегиб дистального профиля кости при переходе на латеральный мышелок (рис. 2). Последний признак представляет вероятную апоморфию Procellariiformes и встречается у альбатросовых (Diomedidae) и Procellariidae. В то же время у современных Diomedidae дистальный эпифиз более выражено расширяется дистально, чем у экз. ПИН, № 2612/6, а дистальная апертура разгибательного канала медиолатерально вытянута (узкая). У описываемого экземпляра дистальная апертура более узкая и по форме сходна с таковой Procellariidae.

При виде с латеральной стороны характерно отсутствие вогнутости при переходе со стержня на латеральный мышелок — опять же, как у Procellariidae, но в отличие от Diomedidae. Кроме того, у альбатросов латеральный мышелок несколько отстает латерально относительно стержня, в то время как у описываемого экземпляра и буревестников он располагается на уровне латерального края стержня. В то же время характерной отличительной чертой экз. ПИН, № 2612/6 является слабая выдвинутость медиального мышелка краниально (может быть несколько уменьшена у ископаемого экземпляра за счет плохой сохранности) — эта особенность отличает описываемую находку как от современных буревестников, так и от альбатросов.

От Gaviiformes, имеющих отчасти сходное строение тибиотарсуса, кыштырлинская птица отличается проксимально расположенными дистальной апертурой разгибательного канала и надсухожильным мостиком (обе структуры смещены дистально у гагар). От Pelagornithidae экз. ПИН, № 2612/6 отличается слабым перегибом стержня медиально: у Pelagornithidae (и, в частности, у сходного по размерам *Lutetodontopteryx tethyensis* Mayr et Zvonok, 2012 из эоцена Восточной Европы [8]) на уровне непосредственно проксимальнее надсухожильного мостика медиальный край кости вогнутый. Кроме того, у Pelagornithidae имеется уплощенная поверхность при переходе от стержня к латеральному мышелку на краниальной стороне кости (как у альбатросов), при этом отчетливый перегиб при переходе от *incisura intercondylaris* к латеральному мышелку в дистальном крае отсутствует. Дистальный эпифиз у экз. ПИН, № 2612/6 уже, чем у *Lutetodontopteryx tethyensis* при сопоставимой ширине стержня.



Рис. 2. Тибиотарсусы ископаемой птицы (Procellariiformes indet.) из эоцена Западной Сибири в сравнении с избранными современными Procellariiformes: а, б, д, е — экз. ПИН, № 2612/6, дистальный фрагмент правого тибиотарсуса; местонахождение Кыштырлинский карьер, Тюменская область, эоцен; в, ж — *Thalassarche melanophrys* (Diomedidae), экз. остеологической коллекции ПИН, № 7-7-1, современный; г, з — *Ardenia gravis* (Procellariidae), экз. остеологической коллекции ПИН, № 8-52-1, современный; а, в—д — с краниальной стороны (а—г — фотографии, д — компьютерная модель), б — с латеральной стороны, е—з — с дистальной стороны. Обозначения: см, медиальный мыщелок; cl, латеральный мыщелок; da, дистальная апертюра canalis extensorius; iic, межмыщелковая вырезка; pst, надсухожильный мостик; pt, перегиб в дистальном профиле кости при переходе на латеральный мыщелок.

Различение семейств Procellariiformes по фрагментарным костным остаткам не всегда возможно, однако крупные размеры птицы из Кыштырлинского карьера позволяют сопоставлять ее с альбатросами (остальные представители отряда трубконосых заметно мельче). Крупный размер кроновых Diomedidae связан с их адаптацией к динамическому парению, однако створчатые эоцено-олигоценовые альбатросы в основном отличались мелкими размерами и, по-видимому, еще не были настолько специализированы к этому типу полета [1, 9]. Последнее также справедливо и для крупного альбатроса *Tydeia* из раннего олигоцена Бельгии [9]. Этот вид известен только по костям передней конечности, но по размерам он соответствует описываемой в этой работе находке и может представлять ту же или близкую форму. Примечательно, что фауна акул Кыштырлинского

карьера также включает формы, известные из олигоцена и даже миоцена [6].

Находка крупной трубконосой птицы в эоцене Западной Сибири имеет значение для понимания ранней эволюционной истории альбатросов. Древнейшие предполагаемые Diomedidae, заметно более мелкие, чем современные представители семейства, известны из верхнего ипра Антарктики [10]. В Северном Полушарии древнейшая предполагаемая находка группы — мелкий *Murunkus subitus* Panteleyev et Nesov, 1993 из верхнего лютета — бартон Узбекистана [11]. Крупные эоценовые трубконосы («створчатые альбатросы») представлены только кыштырлинской находкой, а также плохо сохранившимся тибиотарсусом из верхнего бартон — приабона Антарктики (остров Симор), предположительно отнесенном к Diomedidae [10]. Несмотря на плохую сохранность, эта антарктическая форма сходна

с кыштырлинской общими очертаниями и размерами. Таким образом, не позднее позднего эоцена стволые альбатросы или близкие к ним крупные трубконосые уже могли иметь всесветное распространение. Их появление в палеонтологической летописи в эоцене в целом соответствует предполагаемой позднеэоценовой дивергенции Diomedidae по молекулярным данным [12], а, возможно, и удревняет ее (с учетом вероятного среднеэоценового возраста отложений Кыштырлинского карьера). В то же время морфологические отличия в строении костей конечностей стволых альбатросов по сравнению с современными Diomedidae, а также существование крупных эоценовых трубконосых в том числе в полузамкнутом мелководном эпиконтинентальном бассейне в Западной Сибири, указывают на иные адаптации и образ жизни этих птиц.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны акад. А.В. Лопатину (ПИН РАН) за замечания по тексту статьи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-00470, <https://rscf.ru/project/24-24-00470/>.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них отсутствует конфликт интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работы с живыми животными не проводились; исследование выполнено на музейных материалах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mayr G. Paleogene Fossil Birds, Second ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2022. 239 p.
2. Зеленков Н.В., Курочкин Е.Н. Класс Aves // Ископаемые рептилии и птицы. Часть 3. / Ред. Е.Н. Курочкин, А.В. Лопатин, Н.В. Зеленков. Москва, ГЕОС, 2015. С. 86–290.
3. Ахметьев М.А. Проблемы стратиграфии и палеогеографии палеогена средних широт центральной Евразии // Геология и геофизика. 2011. Т. 52. № 10. С. 1367–1387.
4. Васильева О.Н. Диноцисты морского палеогена Зауралья // Ежегодник-2015. Труды ИГГ УрО РАН. 2016. Вып. 162. С. 8–20
5. Попов С.В., Трубин Я.С., Смирнов П.В., и др. О составе моллюсков тавдинской свиты эоцена Западной Сибири // Палеонтологический журнал. 2019. № 1. С. 24–33.
6. Малышкина Т.П., Масленников А.А. Эоценовые эласмобранхии из Тавдинской свиты в окрестностях г. Тюмень // Био- и геособытия в истории Земли. Этапность эволюции и стратиграфическая корреляция. Материалы LXIX сессии палеонтологического общества. СПб, Картфабрика ВСЕГЕИ, 2023. С. 228–229.
7. Смирнов П.В., Дерягина О.И., Новоселов А.А., и др. Глины тавдинской свиты эоцена: литогеохимические и седиментологические аспекты (Кыштырлинское месторождение, Западная Сибирь) // Известия Томского политехнического университета. Инжиниринг георесурсов. 2019. Т. 330. № 11. С. 130–144.
8. Mayr G., Zvonok E. A new genus and species of Pelagornithidae with well-preserved pseudodontition and further avian remains from the middle Eocene of the Ukraine // Journal of Vertebrate Paleontology. 2012. V. 32. № 4. P. 914–925.
9. Mayr G., Smith T. A fossil albatross from the early Oligocene of the North Sea Basin // Auk. 2012. V. 129. № 1. P. 87–95.
10. Acosta Hospitaleche C., Gelfo J.N. Procellariiform remains and a new species from the latest Eocene of Antarctica // Historical Biology. 2017. V. 29. № 6. P. 755–769.
11. Пантелеев А.В., Несов Л.А. Мелкий представитель трубконосых (Aves: Procellariiformes) эоцена Средней Азии // Труды Зоологического института АН СССР. 1993. Т. 252. С. 95–103.
12. Kuhl H., Frankl-Vilches C., Bakker A., et al. An unbiased molecular approach using 3'-UTRs resolves the avian family-level tree of life // Molecular Biology and Evolution. 2021. V. 38. № 1. P. 108–127.

LARGE MARINE BIRD (AVES: PROCELLARIIFORMES) IN THE EOCENE OF WESTERN SIBERIA

**N. V. Zelenkov^{1, #}, M. P. Maslintsyna², T. P. Malyshkina³, A. A. Maslennikov⁴,
E. V. Syromyatnikova¹, D. O. Gimranov⁵**

Presented by academician of the RAS A.V. Lopatin

¹*Borissiak Paleontological institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

²*Ural Federal University named after the First President of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russian Federation*

³*Zavaritsky Institute of Geology and Geochemistry, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
Ekaterinburg, Russian Federation*

⁴*NOVATEK STC, Tyumen, Russian Federation*

⁵*Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
Ekaterinburg, Russian Federation*

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

The article describes the first find of a bird from the Paleogene of Siberia. A tibiotarsus fragment from the Eocene Tavda Formation of the Tyumen Region (Western Siberia) is referred to Procellariiformes. The described bird is morphologically closer to Procellariidae, but comparable in size to albatrosses (Diomedidae) and, apparently, represents the stem representatives of this family. The find indicates for the first time that either stem albatrosses or large Procellariiformes similar to them could have had a worldwide distribution already in the Eocene.

Keywords: fossil birds, Eocene, Western Siberia, Tavda Formation, Kyshtyrlinsky quarry

УДК 577.218

БЕЛОК Z4 ДРОЗОФИЛЫ ИМЕЕТ В СВОЕМ СОСТАВЕ ДИМЕРИЗУЮЩИЙСЯ ZAD-ДОМЕН

© 2024 г. А. Н. Бончук¹*, академик РАН П. Г. Георгиев¹

Поступило 25.04.2024 г.

После доработки 22.05.2024 г.

Принято к публикации 22.05.2024 г.

Транскрипционный фактор Z4 (putzig) дрозофилы является одним из ключевых белков, определяющих структуру хроматина у дрозофилы. Он локализуется на границах «дисков» политемных хромосом, которые, согласно современным представлениям, соотносятся с хроматиновыми доменами. Белок Z4 является компонентом белкового комплекса, в который также входят белки Chromator и BEAF-32, для взаимодействия с которыми необходим консервативный домен на N-конце Z4. В данном исследовании мы показали, что этот домен является ZAD (Zinc-finger associated). При помощи биохимических методов подтверждена способность данного домена к димеризации. При помощи AlphaFold2 получена модель димера данного домена, структура которой подтверждена при помощи малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (МУРР/SAXS). Структура димера демонстрирует укладку, типичную для ZAD-доменов.

Ключевые слова: архитектурные белки C2H2, цинковые пальцы, фактор транскрипции, ZAD, МУРР

DOI: 10.31857/S2686738924050049

Хромосомы высших эукариот организованы в топологически связанные домены (ТАД). У дрозофилы участки хроматина, разделяющие ТАД, активно взаимодействуют друг с другом, образуя петли хроматина [1]. Было показано, что границы ТАД часто совпадают с междисками политемных хромосом, в которых находятся промоторы генов домашнего хозяйства [2]. Согласно последним данным, в «дисках» политемных хромосом локализован транскрипционно активный хроматин; а в «междисках» расположен хроматин, в котором активность генов подавлена [3]. Формирование границ ТАД у дрозофилы, вероятно, обусловлено связыванием определенных белков, которые в свою очередь привлекают белковые комплексы, изменяющие свойства окружающего хроматина (в частности, сниженный уровень H3K27me3 [4]). Белки Z4/putzig, а также его партнеры Chriz/Chromator и BEAF-32 локализованы в междисках политемных хромосом по данным иммунофлуоресцентного окрашивания [5–7], а также на границах ТАД по данным Hi-C и ChIP-seq анализов [4]. Искусственное привлечение белка Chromator приводит к декомпактизации участков хроматина, но не влияет на их транскрипционный статус [8]. Данные белки экспрессируются

на всех стадиях онтогенеза, иммунопреципитируют в общем комплексе, непосредственно взаимодействуют друг с другом, необходимы для поддержания структуры интерфазных хромосом [4–6, 9, 10]. Было показано, что белок Z4 участвует в регуляции транскрипции ряда генов [11]. Например, Z4 является компонентом TRF2-зависимого комплекса [12] и ассоциирован с хроматин-ремоделирующим комплексом NURF [13]. Белок Z4 также участвует в привлечении на хроматин конденсиновых комплексов [14].

Белок Z4 можно отнести к классу C2H2 белков, которые имеют кластеры ДНК-связывающих цинковых пальцев C2H2 типа (рис. 1а). На N-конце белка Z4 был выявлен консервативный среди насекомых домен, необходимый для взаимодействия с белками Chromator и BEAF-32 [6, 9]. В аминокислотной последовательности этого домена (рис. 1б) присутствуют два мотива, состоящие из пары консервативных цистеинов разделенных двумя аминокислотными остатками (CxxC), что, в частности, характерно для ZAD (Zinc-finger associated)-доменов. Выравнивание аминокислотной последовательности N-концевого домена Z4 и известных ZAD-доменов показало присутствие и других консервативных аминокислотных остатков (рис. 1в). ZAD-домены имеют схожую пространственную укладку при крайне низкой гомологии первичной аминокислотной последовательности [15, 16], чем и объясняется то, что данный

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена

Российской академии наук (ИБГ РАН), Москва, Россия

*E-mail: bonchuk_a@genebiology.ru

домен не был аннотирован ни в одной существующей базе данных белковых доменов. Для ZAD-доменов характерна укладка из двух альфа-спиралей типа «скрипичный ключ», стабилизированная атомом цинка, скоординированным четырьмя консервативными цистеинами [15].

Поскольку все известные ZAD-домены формируют димеры (в некоторых случаях тетрамеры из двух димеров [15]), мы исследовали способность ZAD-домена белка Z4 ($Z4^{71-184}$) к димеризации. Химическая сшивка при помощи глутаральдегида выявила присутствие димеров, а также более высокомолекулярные продукты сшивки (рис. 1г),

которые могут быть как следствием образования мультимеров более высокого порядка, так и следствием агрегации. Гель-фильтрация на носителе Superdex 75 показала, что кажущаяся молекулярная масса $Z4^{71-184}$ в растворе составляет порядка 55 кДа (рис. 1д), что также в большей степени согласуется с формированием тетрамера подобно известной тетрамеризации ZAD-домена белка Pita [15]. Однако профиль гель-фильтрации сильно зависит от формы молекулы и присутствия развернутых участков. Чтобы точнее определить олигомерный статус ZAD-домена белка Z4, мы применили метод малоуглового рассеяния рентгеновских лучей

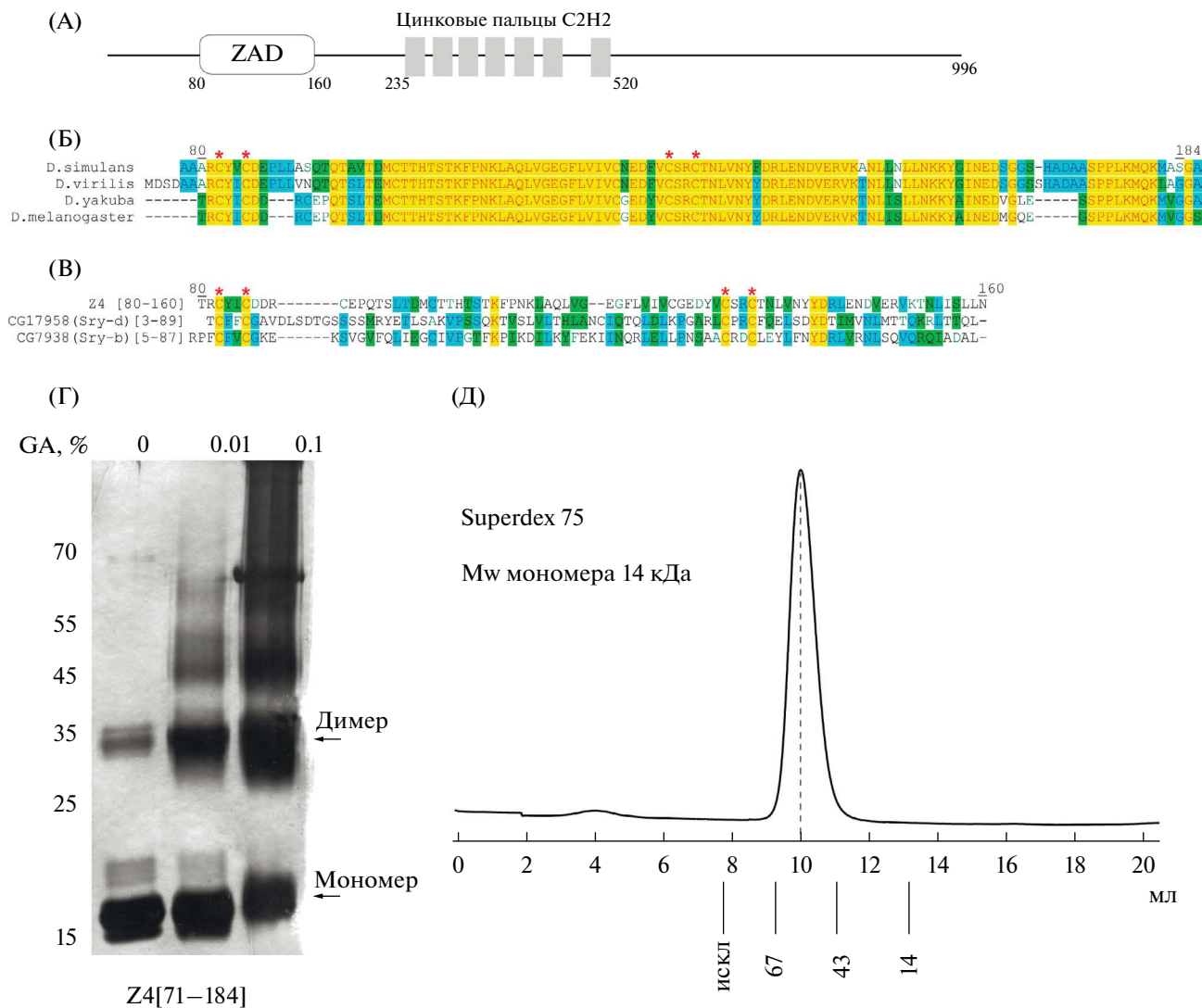


Рис. 1. Белок Z4 имеет в своем составе димеризующийся ZAD-домен. (а) Доменная структура белка Z4. (б) Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей N-концевого консервативного домена из ортологов Z4 из различных видов *Drosophila*. Красными звездочками отмечены консервативные цистеины, координирующие ионы цинка. (в) Выравнивание последовательностей N-концевого консервативного домена Z4 и ZAD-доменов белков *Serendipity* дрозофилы. (г) Сшивка $Z4^{71-184}$ с использованием возрастающих концентраций глутарового альдегида (GA). (д) Гель-фильтрация $Z4^{71-184}$ на носителе Superdex S75. Под хроматограммой показаны объемы элюции маркерных белков с указанной молекулярной массой.

Таблица 1. Параметры малоуглового рентгеновского рассеяния для ZAD-доменов белков Z4 *Drosophila melanogaster* (dm) и *D. virilis* (dv). Rg – радиус гирации, Dmax – максимальный размер частиц, Vp – Porod volume – объем частиц.

Образец	Концентрация, мг/мл	Rg, нм	Dmax, нм	Vp, нм ³	Рассчитанная молекулярная масса, кДа	Молекулярная масса мономера, кДа
dmZ4 ^{71–184}	5.0	3.2	9.2	52.4	31–46.5	14.2
dmZ4 ^{71–184}	1.0	3.2	7.83	35.5	20.2–29.8	14.2
dvZ4 ^{66–155}	2.5	2.54	7.3	36.5	20.8–31.2	10.5
dvZ4 ^{66–155}	1.0	2.31	7.1	32.8	19.2–28.8	10.5

(МУРР/SAXS). Были изучены ZAD-домены белков Z4 *Drosophila melanogaster* и *D. virilis*. Параметры рассеяния приведены в таблице 1.

Молекулярный вес, определенный на основе экстраполяции интенсивности рассеяния при нулевом значении угла рассеяния [17], однозначно подтверждает димеризацию ZAD-доменов белков Z4 обоих видов дрозофил.

Взаимодействия ZAD-доменов с другими белковыми доменами до сих пор не изучены, поэтому, вероятно, ZAD-домен белка Z4 может иметь необычные структурные особенности. С целью

установления структуры нами были предприняты попытки кристаллизации, однако оказалось, что ZAD-домен белка Z4 в значительной степени подвержен агрегации при высокой концентрации во всех протестированных нами буферах. Поэтому мы получили структуру димера этого домена при помощи моделирования в AlphaFold2 [18] с последующим подтверждением структуры при помощи SAXS.

Моделирование в AlphaFold2 с высокой достоверностью предсказывает каноническую структуру димера ZAD (рис. 2а, б), наиболее

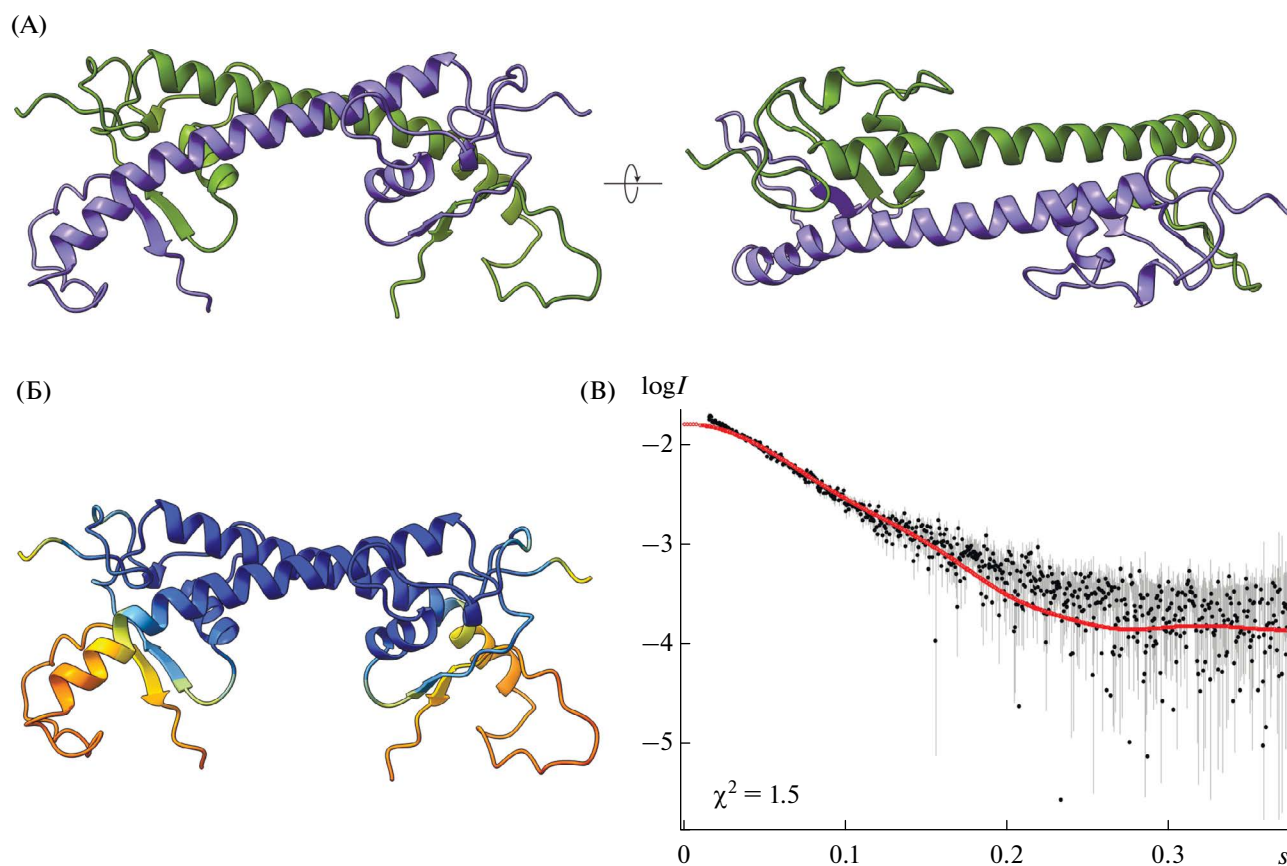


Рис. 2. Изучение структуры ZAD-домена белка Z4 при помощи AlphaFold и SAXS. (а) Структура димера ZAD-домена белка Z4, полученная при помощи AlphaFold. (б) Достоверность полученной модели, окрашенная в соответствии со значением метрики pLDDT. (в) Сопоставление экспериментальных интенсивностей малоуглового рассеяния рентгеновских лучей в растворе с теоретическими кривыми (красная линия), рассчитанными на основе модели AlphaFold с помощью программы CRY SOL. LogI – логарифм интенсивности сигнала, s – вектор угла рассеяния.

схожую с известной структурой ZAD-домена белка Serendipity-d, имеющего характерную бета-шпильку [15]. Сопоставление спектров малоуглового рассеяния рентгеновских лучей ZAD-домена белка Z4 в растворе с теоретическими кривыми, рассчитанными на основе модели AlphaFold, с помощью программы CRY SOL [19] показывает достоверно высокое соответствие ($\chi^2 = 1.5$ (значение меньше 3.84 для 5% доверительного интервала)) модели и экспериментальных данных, причем наибольшее расхождение наблюдается в области профиля рассеяния с наибольшими значениями угла рассеяния, соответствующего мелким элементам структуры, что говорит о том, что основные элементы предсказанной структуры соответствуют нативной структуре данного домена в растворе.

Таким образом, нами показано присутствие консервативного ZAD-домена, обладающего димеризующей активностью, в ключевом архитектурном белке дрозофилы Z4. Димеризация, очевидно, важна для функционирования данного белка, для других ZAD-C2H2 белков, например, было показано, что димеризация необходима для поддержания взаимодействий между удаленными сайтами связывания этих белков [20]. Также димеризация домена может создавать платформу для эффективного взаимодействия с другими факторами, например, партнерами Z4 — белками Chromator и BEAF-32.

кДНК, кодирующая фрагмент белка Z4 71–184 а.о., была клонирована в модифицированный вектор pGEX, содержащий сайт разрезания TEV-протеазы между GST и кДНК. Экспрессия, очистка белка, а также химическая сшивка и эксперименты по малоугловому рассеянию проводилась как описано ранее [15]. Модель димера была построена при помощи программы AlphaFold 2.3.0-Multimer на локальной рабочей станции. Соответствие модели и экспериментальных данных было оценено с помощью программы CRY SOL [19] как описано ранее [15] на основе метрики χ^2 .

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта РФФ проект № 19-74-10099-П.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

В работе не проводились исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang Q., Sun Q., Czajkowsky D.M., Shao Z. Sub-kb Hi-C in *D. melanogaster* reveals conserved characteristics of TADs between insect and mammalian cells, // *Nat Commun.* 2018. 9: 188.
2. Zhimulev I., Vatolina T., Levitsky V., Tsukanov A. Developmental and Housekeeping Genes: Two Types of Genetic Organization in the *Drosophila* Genome, // *Int J Mol Sci.* 2024. 25.
3. Ulianov S.V., Khrameeva E.E., Gavrilov A.A., et al. Active chromatin and transcription play a key role in chromosome partitioning into topologically associating domains, // *Genome Res.* 2016. 26: 70–84.
4. El-Sharnouby S., Fischer B., Magbanua J.P., et al. Regions of very low H3K27me3 partition the *Drosophila* genome into topological domains, // *PLoS One.* 2017. 12: e0172725.
5. Eggert H., Gortchakov A., Saumweber H. Identification of the *Drosophila* interband-specific protein Z4 as a DNA-binding zinc-finger protein determining chromosomal structure, // *J Cell Sci.* 2004. 117: 4253–64.
6. Gan M., Moebus S., Eggert H., Saumweber H. The Chriz-Z4 complex recruits JIL-1 to polytene chromosomes, a requirement for interband-specific phosphorylation of H3S10, // *J Biosci.* 2011. 36: 425–38.
7. Gortchakov A.A., Eggert H., Gan M., et al. Chriz, a chromodomain protein specific for the interbands of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes, // *Chromosoma.* 2005. 114: 54–66.
8. Pokholkova G.V., Demakov S.A., Andreenkov O.V., et al. Tethering of CHROMATOR and dCTCF proteins results in decompaction of condensed bands in the *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes but does not affect their transcription and replication timing, // *PLoS One.* 2018. 13: e0192634.
9. Melnikova L.S., Molodina V.V., Kostyuchenko M.V., et al. The BEAF-32 Protein Directly Interacts with Z4/putzig and Chriz/Chromator Proteins in *Drosophila melanogaster*, // *Dokl Biochem Biophys.* 2021. 498: 184–9.
10. Melnikova L.S., Kostyuchenko M.V., Georgiev P.G., Golovnin A.K. The Chriz Protein Promotes the Recruitment of the Z4 Protein to the STAT-Dependent Promoters, // *Dokl Biochem Biophys.* 2020. 490: 29–33.
11. Kober L., Zimmermann M., Kurz M., et al. Loss of putzig in the germline impedes germ cell development by inducing cell death and new niche like microenvironments, // *Sci Rep.* 2019. 9: 9108.
12. Hochheimer A., Zhou S., Zheng S., et al. TRF2 associates with DREF and directs promoter-selective gene expression in *Drosophila*, // *Nature.* 2002. 420: 439–45.
13. Kugler S.J., Nagel A.C. A novel PzG-NURF complex regulates Notch target gene activity, // *Mol Biol Cell.* 2010. 21: 3443–8.
14. Puerto M., Shukla M., Bujosa P., et al. The zinc-finger protein Z4 cooperates with condensin II to regulate

- somatic chromosome pairing and 3D chromatin organization, // *Nucleic Acids Res.* 2024.
15. Bonchuk A.N., Boyko K.M., Nikolaeva A.Y., et al. Structural insights into highly similar spatial organization of zinc-finger associated domains with a very low sequence similarity, // *Structure.* 2022. 30: 1004–15 e4.
16. Bonchuk A., Boyko K., Fedotova A., et al. Structural basis of diversity and homodimerization specificity of zinc-finger-associated domains in *Drosophila*, // *Nucleic Acids Res.* 2021. 49: 2375–89.
17. Mylonas E., Svergun D.I. Accuracy of molecular mass determination of proteins in solution by small-angle X-ray scattering, // *J Appl Crystallogr.* 2007. 40: S245–S9.
18. Jumper J., Evans R., Pritzel A., et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, // *Nature.* 2021. 596: 583–9.
19. Svergun D.I., Barberato C., Koch M.H.J. CRY SOL – a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates // *J Appl Cryst.* 1995. 28: 768–73.
20. Kyrchanova O.V., Bylino O.V., Georgiev P.G. Mechanisms of enhancer-promoter communication and chromosomal architecture in mammals and *Drosophila*. // *Front Genet.* 2022. 13: 1081088.

DROSOPHILA PROTEIN Z4 HAS N-TERMINAL ZAD DIMERIZATION DOMAIN

A. N. Bonchuk^{1, #}, Academician of the RAS P. G. Georgiev¹

¹*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

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

Drosophila transcription factor Z4 (putzig) is one of the key proteins that determines chromatin structure in *Drosophila*. It is localized at the boundaries of the “bands” of polytene chromosomes, which, according to modern concepts, correlate with chromatin domains. The Z4 protein is a component of a protein complex that also includes the Chromator and BEAF-32 proteins, which require a conserved domain at the N-terminus of Z4 to interact with them. In this study, we showed that this domain is a ZAD (Zinc-finger associated). Using biochemical methods, the ability of this domain to dimerize was confirmed. A dimer model of this domain was obtained using AlphaFold2, the structure of which was confirmed using small-angle X-ray scattering (SAXS). The dimer structure shows a fold typical of ZAD domains.

Keywords: architectural C2H2 proteins, zinc-finger proteins, transcription factor, ZAD, SAXS

УДК 569.742.6:551.793

ПЕЩЕРА ТИП-ТУГАЙ – ПЕРВОЕ ЛОГОВО ПЕЩЕРНОЙ ГИЕНЫ *CROCUTA SPELAEA* (GOLDFUSS, 1823) НА УРАЛЕ

© 2024 г. Д. Р. Хантемиров¹, А. В. Кочнев¹, Т. В. Струкова², Д. О. Гимранов², П. А. Косинцев²

Поступило 12.02.2024 г.

После доработки 12.03.2024 г.

Принято к публикации 20.03.2024 г.

Описано новое местонахождение с остатками *Crocuta spelaea* (Goldfuss, 1823) в пещере Тип-Тугай (52°59'28.6"N, 57°00'22.3"E) на Южном Урале. На основе анализа видового состава фауны крупных и мелких млекопитающих отложения, содержащие остатки гиены, датируются морской изотопной стадией 3 (MIS 3). Исследование возрастного состава остатков гиены и характера повреждений костей крупных млекопитающих показало, что пещера Тип-Тугай использовалась хищником в качестве нательного логова. Это первое задокументированное логово пещерных гиен на территории Урала.

Ключевые слова: *Crocuta spelaea*, поздний плейстоцен, логово гиен, Южный Урал

DOI: 10.31857/S2686738924050052

Древние логова хищных млекопитающих представляют собой уникальный объект для палеонтологических исследований. Изучение таких местонахождений позволяет получить данные не только по истории фауны позвоночных, но и об особенностях экологии и этологии хищников в прошлом. Особый интерес представляют логова, которые использовались одним видом хищника, однако они встречаются достаточно редко [1, 2].

Одним из видов, использовавшим пещеры как логова, является пещерная гиена *Crocuta spelaea* (Goldfuss, 1823), которая была ключевым членом гильдии хищников в фаунах позднего плейстоцена Евразии [3]. В настоящее время на территории Европы известно более ста местонахождений, содержащих остатки *C. spelaea* [4]. При этом только некоторые из них описывались однозначно как логова гиен [2, 5, 6]. На территории России таких местонахождений известно еще меньше: Баракаевская пещера на Северном Кавказе и Денисова пещера на Алтае [2]. На Урале остатки *C. spelaea* найдены в 14 местонахождениях, однако эти находки, как правило, представлены отдельными зубами или костями, и ни одно из них не было описано как логово гиен [7, 8].

Логова пещерных гиен имеют ряд общих признаков. Для них характерно большое количество остатков гиен, 10–30% от общего количества остатков

крупных млекопитающих, и они представлены особями разных возрастов. В таких местонахождениях присутствуют следы деятельности гиен – кости крупных травоядных со следами погрызов, есть кости и зубы со следами пережевывания, могут быть копролиты гиен [2, 9]. Характерно наличие следов каннибализма – костей гиен со следами погрызов гиенами [10]. Если в возрастном составе преобладают молодые особи, то пещера могла использоваться как нательное логово (родильная камера) [5]. Для таких местонахождений также характерны фрагменты трубчатых костей крупных млекопитающих, обглоданные щенками гиен с одного или двух концов, так называемые палки для глодания (nibbling sticks) [11].

В 2021 году членами магнитогорского клуба спелеологов «Протей» была открыта пещера Тип-Тугай. Это местонахождение по количеству костных остатков пещерной гиены является одним из самых крупных на Урале, наряду с пещерами Смеловская II и Усть-Катавская [8, 12]. Цель данной работы – на основании анализа остатков гиен и сопутствующей фауны крупных млекопитающих определить тафономический тип местонахождения в пещере Тип-Тугай.

Пещера находится в Бурзянском районе Республики Башкортостан на территории национального парка «Башкирия» (52°59'28.6"N, 57°00'22.3"E), на правом берегу р. Белая, на высоте 365 м н.у.м. Пещера коридорного типа, вход ориентирован на юг, пол плавно поднимается вверх; длина основного хода составляет 83 м, средняя ширина – 2.2 м, высота – 1.5 м, амплитуда – 7 метров.

¹Уральский федеральный университет имени первого президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

²Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, Россия

*e-mail: hantemirov.d@mail.ru

Раскоп был заложен в 40 м от входа и имел размеры 1.5 x 1.5 м. Рыхлые отложения представлены коричневым суглинком, мощностью около 1 м. Отложения достаточно однородны литологически и не имеют четко выраженной стратиграфии, только в нижних горизонтах (на глубине 0.8–1.0 м) отмечено слабое потемнение грунта. Как на поверхности пещеры, так и в толще отложений встречаются угловато-окатанные обломки известняка размером от 1 до 10 см, с глубиной их количество значительно уменьшается. Отложения выбирались условными горизонтами мощностью 10 см параллельно поверхности. Весь грунт промывался на ситах с ячейкой размером 0.1 см. Костные остатки представлены во всех горизонтах. Максимальное количество извлечено с глубины 40–60 см.

По степени фоссилизации и прокрашенности костные остатки можно разделить на два типа. Первый тип составляют слабо фоссилизированные кости кремового и светло-желтого цвета. Основная масса костей этого типа обнаружена на поверхности пещеры и в верхних горизонтах (до 0.4 м). Это кости голоценового типа.

Второй тип составляют фоссилизированные кости черного, темно-желтого и темно-серого цвета. Основная масса костных остатков этого типа сосредоточена в средней толще отложений (40–60 см), хотя кости этого типа встречаются и на полу пещеры. Эти кости имеют позднеплейстоценовый возраст. В одном горизонте могут присутствовать кости обоих типов. В данной работе рассматривается костный материал только второго типа фоссилизации и прокрашенности.

Коллекция костных остатков из пещеры Тип-Тугай хранится в музее Института экологии растений и животных УрО РАН (колл. № 2400).

Фауна травоядных крупных млекопитающих включает: мамонта *Mammuthus primigenius* Blumenbach, 1799, лошадь *Equus* sp., шерстистого носорога *Coelodonta antiquitatis* (Blumenbach, 1799), гигантского оленя *Megaloceros giganteus* (Blumenbach, 1799), бизона *Bison priscus* Bojanus, 1827, сайгу *Saiga tatarica* (L., 1776), верблюда *Camelus* sp.

Из представителей отряда хищных млекопитающих помимо семейства Нюаениidae, представленного остатками гиены *C. spelaea*, найдены остатки представителей семейств Canidae: волк *Canis lupus* (L., 1758), лисица *Vulpes vulpes* (L., 1758); Ursidae: бурый медведь *Ursus arctos* (L., 1758), большой пещерный медведь *U. kanivets* Vereshchagin, 1973; Mustelidae: куница *Martes* sp., росомаха *Gulo gulo* (L., 1758), хорь степной *Mustela eversmanii* Less., 1827, ласка *M. nivalis* (L., 1766), горноста́й *M. erminea* (L., 1758), *Mustela* sp.; Felidae: пещерный лев *Panthera spelaea* (Goldfuss, 1810).

Видовой состав мелких млекопитающих включает представителей трех отрядов (Eulipotyphla,

Lagomorpha, Rodentia): крот *Talpa europaea* (L., 1758), заяц *Lepus* sp., бобр *Castor fiber* (L., 1758), бурозубка *Sorex* sp., пищуха *Ochotona* sp., суслик *Spermophilus* sp., сурок *Marmota bobak* (Muller, 1776), большой тушканчик *Allactaga major* (Kerr, 1792), земляной зайчик *Allactagulus* sp., обыкновенный хомяк *Cricetus cricetus* (L., 1758), серый хомячок *Cricetulus migratorius* (Pallas, 1773), хомячок Эверсмана *Allocricetulus evermanni* (Brandt, 1859), обыкновенная слепушонка *Ellobius talpinus* (Pallas, 1770), лесные полевки *Clethrionomys* ex gr. *rutilus*–*glareolus*, степная пеструшка *Lagurus lagurus* (Pallas, 1773), желтая пеструшка *Eolagurus luteus* (Eversmann, 1840), водяная полевка *Arvicola terrestris* (L., 1758), узкочерепная полевка *Lasiopodomys gregalis* (Pallas, 1779), полевка-экономка *Alexandromys oeconomicus* (Pallas, 1776), серые полевки *Microtus* ex gr. *arvalis*–*agrestis*.

Видовой состав фауны как крупных и мелких млекопитающих соответствует облику фауны позднего плейстоцена Южного Урала [13] и может датироваться серединой позднего плейстоцена (Морская изотопная стадия 3, MIS 3). Анализ морфологии зубов узкочерепной полевки – видо-доминанта в фауне мелких млекопитающих – подтверждает этот возраст.

В пещере Тип-Тугай найдено 43 остатка пещерной гиены: 3 фрагмента нижних челюстей, 35 отдельных зубов, фрагмент черепа и 7 костей конечностей. Другие виды крупных хищных млекопитающих представлены единичными находками, и в целом остатки пещерной гиены составляют 33% от общего числа остатков крупных млекопитающих.

Определение индивидуального возраста гиен проведено по характеристикам зубной системы и степени прирастания эпифизов костей [14, 15]. К молодым особям отнесены молочные зубы без следов стертости (возраст от 2 до 8 месяцев), а также молочные зубы со следами стертости и постоянные зубы с не полностью сформировавшимися корнями (от 8 до 12 месяцев). К полувзрослым особям (от 1 до 3 лет) отнесены постоянные зубы без следов стертости и со слабой степенью стертости. К взрослым особям (от 3 до 16 лет) отнесены зубы со средне стертой коронкой. К старым особям (более 16 лет) отнесены сильно стертые зубы, где коронка стерта почти до основания.

В пещере Тип-Тугай найдены зубы особей всех возрастных групп (табл. 1). Молодые особи составили 44% от общего числа, полувзрослые – 31%, взрослые особи – 19%, старые особи – 6% (табл. 1). Все кости конечностей имели полностью приросшие эпифизы и принадлежали минимум одной взрослой особи.

Одновременно с этим большая часть (более 90%) костей крупных травоядных (рис. 1а–е) и все найденные нижние челюсти *C. spelaea* (рис. 1ж, з)

Таблица 1. Возрастной состав пещерных гиен из пещеры Тип-Тугай

Возрастные группы	Молодые		Полувзрослые	Взрослые	Старые
	2–8 месяцев	8–12 месяцев	1–3 года	3–16 лет	>16 лет
Количество зубов	8	10	7	8	2
Минимальное количество особей	3	4	5	3	1

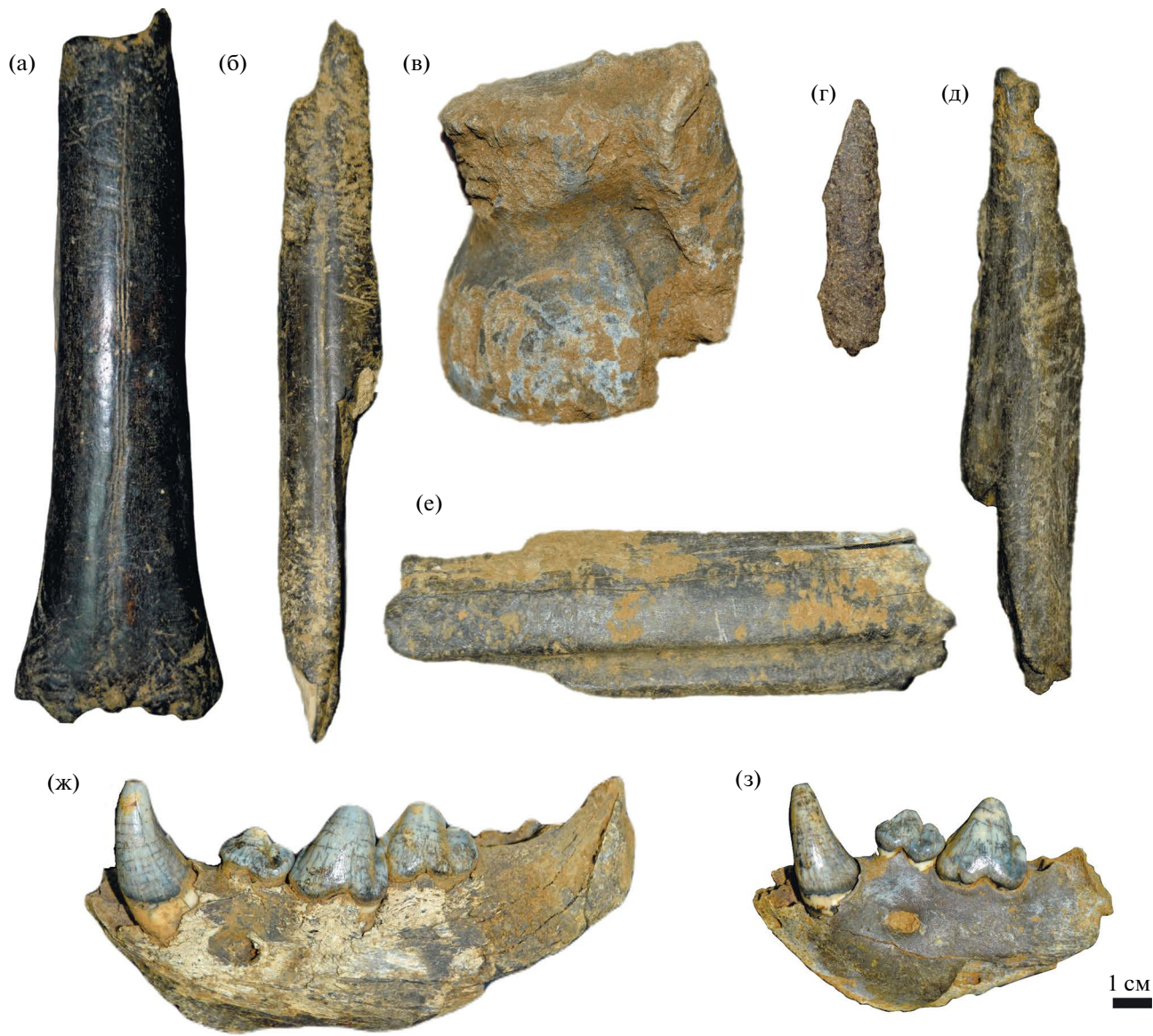


Рис. 1. Кости крупных млекопитающих со следами от зубов *C. spelaea* из пещеры Тип-Тугай. (а) – метаподия *Camelus* sp.; (б, е) – метаподии *M. giganteus*; (в) – таранная кость *C. antiquitatis*; (г, д) – кости неопределенной таксономической принадлежности; (ж, з) – нижние челюсти *C. spelaea*.

имеют следы от зубов гиен. Также найдены кости со следами переваривания (рис. 1г) и обглоданные детенышами фрагменты трубчатых костей крупных млекопитающих (рис. 1б, д, е).

Таким образом, пещерные гиены оказывали значительное влияние на формирование тафоценоза пещеры Тип-Тугай. Большая часть остатков крупных травоядных – бизонов, лошадей,

шерстистых носорогов и мамонтов — имеют характерные погрызы гиен. Эти виды являются типичными объектами охоты для пещерных гиен [11, 16]. Имеются следы каннибализма, и найдены кости со следами переваривания. Это указывает на то, что в пещере Тип-Тугай было логово гиен. В пещере также было найдено большое количество остатков молодых особей гиен в возрасте от 2 до 12 месяцев (44%), и, в целом, молодые и полувзрослые особи являются наиболее многочисленными (75%). Встречаются обглоданные детенышами кости крупных млекопитающих. Все эти факты указывают на то, что гиены на протяжении определенного времени использовали пещеру Тип-Тугай в качестве нательного логова, где они выращивали своих детенышей. Тип-Тугай является первым достоверно описанным логовом пещерных гиен на Урале.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность директору национального парка «Башкирия» В.М. Кузнецову, сотрудникам Л.А. Султангареевой, А.Н. Иванченко и другим членам Магнитогорского клуба спелеологов «Протей», а также Бессоновой В.А., Божко И.В., Добышеву Д.К., Кисагулову А.В., Крохалевой М.А., Павловой М.В., Тарасовой М.А. и Усольцевой А.О. за помощь в организации и проведении раскопок пещеры Тип-Тугай.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Уральского гуманитарного института УрФУ (программа «Мой первый грант»).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В исследовании использовались только ископаемые материалы. Работы с живыми животными не проводились.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не имеют конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jimenez E., Germonpré M., Boudin M. New insights into cave hyena ethology and the implications for territorial competition with hominins in Late Pleistocene north-west Europe: the case of Caverne Marie-Jeanne (Belgium) // *Quaternary Science*. 2022. V. 37. №4. P. 593–611.
2. Барышников Г.Ф. Пещерная гиена (*Crocota spelaea*): тафономия и адаптация // Актуальные вопросы евразийского палеолитоведения. Новосибирск: Издательство Института археологии и этнографии СО РАН. 2005. С. 15–16.
3. Барышников Г.Ф., Верещагин Н.К. Краткий обзор четвертичных гиен (семейство Hyaenidae) России и сопредельных территорий // Труды Зоологического института РАН. 1996. Т. 270. С. 7–65.
4. Lewis M.E., Werdelin L. A revision of the genus *Crocota* (Mammalia, Hyaenidae) // *Palaeontographica*. 2022. V. 322. № 1–4. P. 1–115.
5. Diedrich C.G. Late Pleistocene *Crocota crocuta spelaea* (Goldfuss, 1823) clans as prezewalski horse hunters and woolly rhinoceros scavengers at the open air commuting den and contemporary Neanderthal camp site Westeregeln (central Germany) // *Journal of Archaeological Science*. 2012. V. 39. №6. P. 1749–1767.
6. Harrison R.A. The Uphill Quarry caves, Weston-Super-Mare, a reappraisal // *Proceedings of the University of Bristol Spelaeological Society*. 1977. V. 14. №3. P. 233–254.
7. Кропачева Ю.Э. Пещерная гиена на Урале // Материалы конференции молодых ученых, 31 марта – 4 апреля 2003 года. Екатеринбург: Изд-во «Академкнига». 2003. С. 96–98.
8. Кузьмина С.А. Фаунистические данные по позднепалеолитической стоянке Смеловская II на Южном Урале // Плейстоценовые и голоценовые фауны Урала. Челябинск. 2000. С. 137–153.
9. Rivals F., Baryshnikov G.F., Prilepskaya N.E., Belyaev R.I. Diet and ecological niches of the Late Pleistocene hyenas *Crocota spelaea* and *C. ultima ussurica* based on a study of tooth microwear // *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 2022. V. 601. P. 111–125.
10. Diedrich C.G. An Ice Age spotted hyena *Crocota crocuta spelaea* (Goldfuss 1823) population, their excrements and prey from the Late Pleistocene hyena den of the Sloup Cave in the Moravian Karst, Czech Republic // *Historical Biology*. 2012. V. 24. №2. P. 161–185.
11. Diedrich C.G., Žák K. Prey deposits and den sites of the Upper Pleistocene hyena *Crocota crocuta spelaea* (Goldfuss, 1823) in horizontal and vertical caves of the Bohemian Karst (Czech Republic) // *Bulletin of Geosciences*. 2006. V. 81. №4. P. 237–276.
12. Kosintsev P.A., Bachura O.P. Late Pleistocene and Holocene mammal fauna of the Southern Urals // *Quaternary International*. 2013. V. 284. P. 161–170.
13. Danukalova G. et al. Quaternary deposits and biostratigraphy in caves and grottoes located in the Southern Urals (Russia) // *Quaternary International*. 2020. V. 546. P. 84–124.
14. Kruuk H. The spotted hyena: a study of predation and social behavior. Chicago: University of Chicago Press. 1972. 335 p.

15. *Jimenez I.J. et al.* Ontogenetic dental patterns in Pleistocene hyenas (*Crocota crocuta* Erxleben, 1777) and their palaeobiological implications // International Journal of Osteoarchaeology. 2019. V. 29. №5. P. 808–821.
16. *Diedrich C.G.* Europe's first Upper Pleistocene *Crocota crocuta spelaea* (Goldfuss 1823) skeleton from the Koněprusy Caves: a hyena cave prey depot site in the Bohemian Karst (Czech Republic) // Historical Biology. 2012. V. 24. №1. P. 63–89.

TIP-TUGAI CAVE – THE FIRST CAVE HYENA *CROCUTA SPELAEA* (GOLDFUSS, 1823) DEN IN THE URALS

D. R. Khantemirov^a, A. V. Kochnev^a, T. V. Strukova^b, D. O. Gimranov^b, P. A. Kosintsev^b

^a*Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russian Federation*

^b*Institute of Plant and Animal Ecology UB RAS, Yekaterinburg, Russian Federation*

The new site of Tip-Tugai Cave (52°59'28.6"N, 57°00'22.3"E) is described. The bone-bearing layer is dated at MIS 3 isotope stage based in the fauna of small mammals. Finds of abundant remains of *Crocota spelaea* individuals of different ages and the presence of large herbivores bones with hyena gnaw marks indicate that the Tip-Tugai Cave was used as a hyena den in the Late Pleistocene. This is the first described cave hyena den in the Urals.

Keywords: *Crocota spelaea*, Late Pleistocene, hyena den, Southern Urals

УДК 581.524.2

В СООБЩЕСТВАХ С ДОМИНИРОВАНИЕМ ИНВАЗИОННОГО ДЕРЕВА *ACER NEGUNDO* ИЗБИРАТЕЛЬНО СНИЖАЕТСЯ ВСТРЕЧАЕМОСТЬ АРБУСКУЛЯРНО-МИКОРИЗНЫХ ТРАВ

© 2024 г. Д. В. Веселкин¹*, Д. И. Дубровин¹, О. С. Рафикова¹

Представлено академиком РАН В.Н. Большаковым

Поступило 20.05.2024 г.

После доработки 30.05.2024 г.

Принята к публикации 06.06.2024 г.

Проверяли, обнаруживается ли одно из последствий инвазий чужеродных растений, предсказываемое гипотезой нарушения мутуализма, в отношении клена ясенелистного (*Acer negundo* L.). Целью было установить, одинаково или по-разному изменяется встречаемость микоризных и немикоризных трав в сообществах с разной степенью доминирования *A. negundo*. Проанализировали результаты 78 геоботанических описаний, выполненных в Белорусском Полесье, в Среднем Поволжье и на Среднем Урале. В каждом регионе описали сообщества с доминированием *A. negundo* и без *A. negundo*. Микоризный статус видов растений определили по базе FungalRoot Database. Установили, что с увеличением вероятности формирования арбускулярной микоризы частота регистрации вида под кронами *A. negundo* снижалась. С увеличением вероятности безмикоризного состояния частота регистрации вида под кронами *A. negundo* возрастала. Таким образом, в сообществах с доминированием *A. negundo* встречаемость арбускулярно микоризных трав избирательно снижалась.

Ключевые слова: инвазии растений, механизмы инвазий, гипотеза о разрыве мутуалистических связей, гипотеза деградировавшего мутуализма, растительные сообщества, типы почвенного питания растений, функциональное разнообразие, plant traits

DOI: 10.31857/S2686738924050063

Гипотезы о трансформации чужеродными растениями почвенных условий или о специфичности обратных связей растения-почва — одни из часто обсуждаемых гипотез, объясняющих успех чужеродных растений. Суть таких гипотез состоит в том, что чужеродные растения могут изменять химические или биологические свойства почв в тех местообитаниях, куда они вторгаются, и создавать избирательно благоприятные условия для собственного развития, но неблагоприятные — для местных растений. Интересна гипотеза “деградировавшего мутуализма” или “нарушения мутуализма” [1–3]: если вторгающиеся чужеродные растения менее зависят от микоризных грибов, чем местные растения, это изменяет местные грибные сообщества

и облегчает проникновение неместных немикоризных видов, препятствуя восстановлению местных микоризных видов. Эта гипотеза подтверждена в мета-анализе [3]. Возможно, что деградация или разрыв микоризных связей запускают систему положительных обратных связей, ведущую к усилению инвазионных процессов. Показательный пример обеспечения успешности инвазии путем подавления местных микоризных грибов — инвазия европейской *Alliaria petiolata* в Северной Америке [4, 5].

Мы исследуем разные компоненты обратных связей растения-почва в отношении инвазионного дерева клена ясенелистного (*Acer negundo*), в частности для того, чтобы понять, приводит ли вторжение *A. negundo* в местные сообщества к изменению успешности формирования микоризы у местных растений. Цель работы: установить, одинаково или по-разному изменяется встречаемость микоризных и немикоризных трав в зависимости от степени доминирования *A. negundo*. Если *A. negundo* влияет

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

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

на сообщества грибов арбускулярной микоризы или на микоризообразование у растущих под его пологом растений, это может приводить к смещению под его кронами пропорций между видами трав в сторону преобладания немикоризных видов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Районы. Сбор материала выполнен в трех географических регионах: в Белорусском Полесье, в Среднем Поволжье и на Среднем Урале. В зоне широколиственных лесов в Белорусском Полесье (г. Гомель и окрестности) работы проведены в 2021 г. В лесостепной зоне в Среднем Поволжье (г. Ульяновск и окрестности) работы проведены в 2023 г. В южно-таежной подзоне бореально-лесной зоны (г. Екатеринбург и окрестности) работы проведены в 2018–2019 гг. Во всех регионах климат умеренно континентальный, по классификации [6] — холодный с теплым летним сезоном, в том числе с коротким летним сезоном на Среднем Урале. Сходными являются также преобладающие формы и интенсивность антропогенного воздействия на экосистемы.

Общая схема наблюдений и описания сообществ. Во всех регионах сравнивали попарно сопряженные растительные сообщества с доминированием *A. negundo* в одном из них (обозначение “An+”) и без такого доминирования в другом (“An—”). Сообщества подбирали так, чтобы они находились в близких условиях, т. е. находились в пределах одного элемента ландшафта на расстоянии не более 600 м друг от друга и, по возможности, были выровнены по типу местообитания, степени нарушений, условиям увлажнения и по сомкнутости крон. Таким образом, рассматривали комплекс условий в варианте An— как аналог комплекса условий, которые существовали бы в варианте An+, если бы инвазии *A. negundo* не было. Сформирован массив из 78 описаний (по 39 описаний в сообществах An+ и An—): 24 описания из региона Белорусского Полесья (по 12 описаний в сообществах An+ и An—); 30 описаний из региона Среднего Поволжья (по 15 описаний в сообществах An+ и An—); 24 описания из региона Среднего Урала (по 12 описаний в сообществах An+ и An—).

Доминирующими видами деревьев в описаниях An— были: в Белорусском Полесье — *Acer platanoides*, *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior*, *Pinus sylvestris*, *Populus tremula*, *Quercus robur*, *Robinia pseudoacacia*; в Среднем Поволжье — *Acer platanoides*, *Betula pendula*, *Fraxinus excelsior*, *Populus alba*, *Populus balsamifera*, *Quercus robur*, *Salix euxina*; на Среднем Урале — *Prunus padus*, *Pinus sylvestris*, *Quercus robur*, *Sorbus aucuparia*, *Tilia cordata*, *Malus baccata*, *Salix alba*, *Salix fragilis*, *Ulmus laevis*.

При описании сообществ регистрировали все виды растений, растущих на 400 м² в травяно-кустарничковом (травяном) ярусе. Полный массив включает результаты регистраций 338 видов растений, входящих в состав травяно-кустарничкового яруса.

Избирательность встречаемости видов растений в вариантах сообществ An+ и An—. Из 338 видов отобрали такие, которые встречались минимум в 10% из 78 описаний, т. е. в 8 описаниях и чаще. Таких видов оказалось 68. Для каждого из них определили избирательность встречаемости в сообществах с доминированием *A. negundo* (*S*) как долю встреч вида в сообществах с доминированием *A. negundo*. Значения *S* = 0 указывают, что вид никогда не встречается в зарослях *A. negundo*, значения *S* = 1 указывают на абсолютную приуроченность вида к сообществам с доминированием *A. negundo*.

Микоризный статус видов растений определили с использованием глобальной базы FungalRoot Database [7]. В базе систематизированы результаты обследования на наличие микоризы 14,5 тыс. таксонов растений с числом обследований каждого таксона от 1 до 129. Данные этой базы используются в исследованиях разного дизайна, в том числе при изучении феномена аллелопатии у чужеродных растений [8]. Характеристика микоризного статуса вида растения (*M*) — доля случаев выявленного формирования микоризы у вида от общего числа случаев проверки вида на наличие микориз. При таком подходе характеристика *M* имеет вероятностную интерпретацию: *M* = 0 означает, что микориза у вида не была найдена ни разу, *M* = 0.33 — микориза была найдена в трети обследований, *M* = 1.00 — микоризу находили всегда.

Анализ данных. Использовали расчет коэффициентов корреляции Пирсона (*r*) и Спирмена (*r_s*).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из 68 отобранных видов растений микориза никогда не обнаруживалась (*M* = 0) у четырех: *Alliaria petiolata*, *Moehringia trinervia*, *Catolobus pendulus* и *Silene latifolia* subsp. *alba*. 64 вида с той или иной вероятностью могут образовывать арбускулярную микоризу. Видов с иными типами микориз не было. У 19 видов значения *M* были равны единице, т. е. микориза обнаруживалась всегда. У 45 видов вероятность формирования микоризы варьировала (*M* = 0.20–0.97).

35 из 68 видов встречались в каждом из трех регионов — в Белорусском полесье, в Среднем Поволжье и на Среднем Урале. 26 видов встречались в двух регионах. 7 видов встречены только в одном регионе. Таким образом, в анализируемом массиве преобладали виды с широким географическим

распространением. Каждый из 68 видов хотя бы один раз был зарегистрирован в сообществе с доминированием *A. negundo* и хотя бы один раз — в сообществе без *A. negundo*. Следовательно, в анализируемом массиве не было видов как с абсолютной приуроченностью, так и с абсолютным избеганием сообществ с доминированием *A. negundo*.

По сравнению с контрольными сообществами без *A. negundo*, в сообществах с доминированием *A. negundo* реже встречались виды, у которых микориза регистрировалась всегда или часто. Виды первой группы ($M = 1.00$) — *Agrostis gigantea*, *Carum carvi*, *Sonchus oleraceus*, *Trifolium medium*, *Trifolium repens*, *Vicia cracca*. Виды второй группы ($M = 0.85–0.96$) — *Achillea millefolium*, *Bromus inermis*, *Calamagrostis epigejos*, *Erigeron canadensis*, *Deschampsia cespitosa*, *Lolium pratense*, *Lysimachia vulgaris*, *Poa compressa*, *Tussilago farfara*. Также тенденцию реже встречаться в сообществах с доминированием *A. negundo* показали *Dryopteris carthusiana* и *Sisymbrium officinale*, у которых вероятность обнаружения микоризы была невысокой ($M = 0.33–0.50$).

Имели высокие значения показателя S , т. е. были преимущественно приурочены к сообществам с доминированием *A. negundo*, виды с разными способами почвенного питания: немикоризные ($M = 0$: *Catolobus pendulus*, *Silene latifolia* subsp. *alba*), с промежуточными вероятностями формирования микоризы ($M = 0.33–0.75$: *Chelidonium majus*, *Leonurus quinquelobatus*), постоянно микоризные ($M = 1.00$: *Erigeron annuus*, *Pastinaca sativa*).

Корреляция между вероятностью выявления микоризы (M) и избирательностью встречаемости вида в сообществах с доминированием *A. negundo* (S) была отрицательной и статистически значимой ($r = -0.34$; $P = 0.0047$; $n = 68$; рисунок). Поскольку предположения применения параметрической корреляции не выполнялись, определили также тесноту связи между M и S с помощью коэффициента корреляции Спирмена: $r_s = -0.29$; $P = 0.0164$. Таким образом, с увеличением вероятности формирования арбускулярной микоризы частота регистрации вида под кронами *A. negundo* снижалась. Напротив, с увеличением вероятности безмикоризного состояния частота регистрации вида под кронами *A. negundo* возрастала. Это указывает на избирательное снижение встречаемости арбускулярно микоризных трав в сообществах с доминированием *A. negundo*.

Итак, встречаемость трав с арбускулярной микоризой в сообществах с доминированием *A. negundo* преимущественно снижалась. Немикоризные травы или не демонстрировали негативных тенденций, или под кронами *A. negundo* встречались чаще, чем в прочих сообществах. Это соответствует одному из предсказаний гипотезы “деградирующего мутуализма” или “нарушения

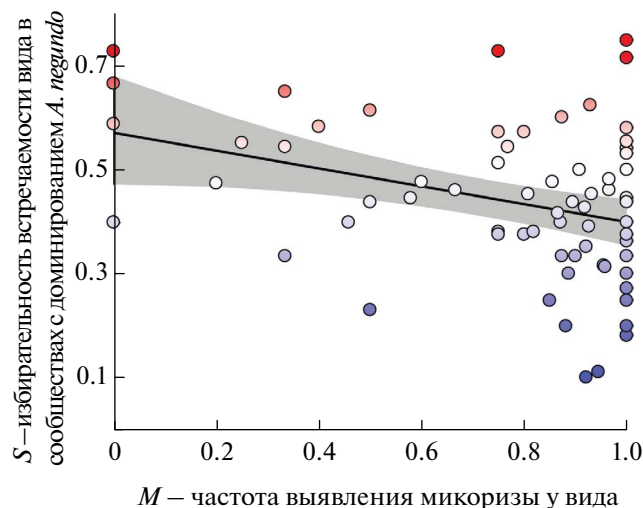


Рис. 1. Зависимость между частотой выявления микоризы у вида в базе FungalRoot Database (M) и избирательностью встречаемости вида в сообществах с доминированием *Acer negundo* (S). Серая заливка — 95%-е доверительные интервалы. Красный компонент заливки точек указывает на преимущественную встречаемость вида в сообществах с доминированием *Acer negundo*, синий — на преимущественное избегание видом сообществ с доминированием *Acer negundo*.

мутуализма” [1–3] об усилении позиций немикоризных растений в сообществах, подвергнувшихся инвазиям. Эта закономерность также согласуется с наблюдавшимся феноменом снижения микоризообразования у растений, выращенных в вегетационных экспериментах на почве из сообществ, трансформированных *A. negundo* [9].

Вероятные причины избирательного снижения встречаемости арбускулярно микоризных трав в подвергшихся инвазии сообществах можно указать лишь гипотетически. Можно предположить, что в почве под густыми кронами *A. negundo* снижается численность грибов арбускулярной микоризы. Исключать этого нельзя, хотя известно, что арбускулярная микориза у *A. negundo* формируется и в первичном [10], и во вторичном [11–13] ареалах. Следовательно, определенный фон микоризных грибов в зарослях *A. negundo* может сохраняться, и “стерилизации” почвы, как это показано, например, для инвазии *Alliaria petiolata* [4, 5] может не происходить. Изменения в зарослях *A. negundo* могут затрагивать не численность, а состав грибов, как это показано для других инвазий [14, 15].

Метаболизм и рост микоризных грибов сильно зависят от поступления фотосинтетически фиксированного углерода (углеводов) от растений. Снижение поступления углерода может быть фактором снижения жизнеспособности микоризных грибов. *A. negundo* способен создавать под своими кронами затенение более сильное, чем аборигенные

древесные виды [16], что обсуждается как механизм его влияния [17]. Затенение снижает эффективность симбиоза для растений [18]. Поэтому, возможно, при лимитировании светом немикоризные растения, не зависящие от грибов, могут получать селективное преимущество над микоризными.

Трансформация сообществ и местообитаний вследствие инвазии *A. negundo* и избирательное снижение встречаемости арбускулярно микоризных трав могут быть не прямо связаны между собой. Немикоризный и микоризный способы почвенного питания — это компоненты широких адаптивных синдромов, описываемых как экологические или фитоценотические стратегии, затрагивающие экофизиологические особенности и жизненные формы видов, особенности воспроизводства и т. п. С немикоризным состоянием часто сопряжены короткий онтогенез и рудеральная экологическая стратегия. Таким образом, не исключено, что снижение встречаемости арбускулярно микоризных трав может быть результатом отсева видов под кронами *A. negundo* по каким-то иным свойствам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы анализировали микоризообразование как функциональный признак в понимании, близком к используемому при анализе функционального разнообразия. Вероятностный подход определения микоризного статуса видов на основе массива опубликованных сведений позволил получить методически единообразные количественные характеристики, пригодные для формального статистического анализа, без часто используемого в таких случаях огрубления данных с выделением дискретных групп видов (“немикоризных”, “мало микоризных”, “облигатно микоризных” и т. п.). С использованием такого подхода в отношении инвазионного дерева *A. negundo* получено подтверждение гипотезы “деградировавшего мутуализма” или “нарушения мутуализма”. Усиление в сообществах, подвергшихся инвазии *A. negundo*, позиций немикоризных трав можно интерпретировать как упрощение структуры сообществ.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00645, <https://rscf.ru/project/23-24-00645/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vogelsang K.M., Bever J.D.* Mycorrhizal densities decline in association with nonnative plants and contribute to plant invasion // *Ecology*. 2009. Vol. 90, № 2. P. 399–407.
2. *Reinhart K.O., Callaway R.M.* Soil biota and invasive plants // *New Phytologist*. 2006. Vol. 170. P. 445–457.
3. *Grove S., Haubensak K.A., Gehring C., et al.* Mycorrhizae, invasions, and the temporal dynamics of mutualism disruption // *Journal of Ecology*. 2017. Vol. 105, № 6. P. 1496–1508.
4. *Stinson K.A., Campbell S.A., Powell J.R., et al.* Invasive plant suppresses the growth of native tree seedlings by disrupting belowground mutualisms // *PLoS Biology*. 2006. Vol. 4, № 5. P. e140.
5. *Roche M.D., Pearse I.S., Sofaer H.R., et al.* Invasion-mediated mutualism disruption is evident across heterogeneous environmental conditions and varying invasion intensities // *Ecography*. 2023. P. e06434.
6. *Beck H.E., Zimmermann N.E., McVicar T.R., et al.* Present and future Köppen–Geiger climate classification maps at 1-km resolution // *Scientific Data*. 2018. № 5. P. 180214.
7. *Soudzilovskaia N.A., Vaessen S., Barcelo M. et al.* FungalRoot: global online database of plant mycorrhizal associations // *New Phytologist*. 2020. Vol. 227, № 3. P. 955–966.
8. *Kalisz S., Kivlin S.N., Bialic-Murphy L.* Allelopathy is pervasive in invasive plants // *Biological Invasions*. 2021. Vol. 23. P. 367–371.
9. *Веселкин Д.В., Рафикова О.С., Екшибаров Е.Д.* Почва из зарослей инвазивного *Acer negundo* неблагоприятна для образования микоризы у аборигенных трав // *Журнал общей биологии*. 2019. Т. 80, № 3. С. 214–225.
10. *Zadworny M., Eissenstat D.M.* Contrasting the morphology, anatomy and fungal colonization of new pioneer and fibrous roots // *New Phytologist*. 2011. Vol. 190, № 1. P. 213–221.
11. *Kovacs G.M., Szigetvari C.* Mycorrhizae and other root-associated fungal structures of the plants of a sandy grassland on the Great Hungarian Plain // *Phyton*. 2002. Vol. 42, № 2. P. 211–223.
12. *Веселкин Д.В., Прокина Н.Э.* Микоризообразование у клена ясенелистного (*Acer negundo* L.) в градиенте урбанизации // *РЖБИ*. 2016. № 1. С. 31–40.
13. *Веселкин Д.В., Пьянков С.В., Сафонов М.А. и др.* Строение поглощающих корней инвазивного и аборигенных видов клена // *Экология*. 2017. № 4. С. 241–249.

14. Бетехтина А.А., Мухачева Т.А., Ковалев С.Ю. и др. Обилие и разнообразие грибов арбускулярной микоризы у инвазивного *Solidago canadensis* и местного *S. virgaurea* // Экология. 2016. № 6. С. 476–480.
15. DeBellis T., Kembel S.W., Lessard J.P. Shared mycorrhizae but distinct communities of other root-associated microbes on co-occurring native and invasive maples // PeerJ. 2019. Vol. 7. P. e7295.
16. Веселкин Д.В., Дубровин Д.И., Рафикова О.С., Лунихина Ю.А., Золотарева Н.В., Подгаевская Е.Н., Пустовалова Л.А., Яковлева А.В. и др. Затенение и перехват света в зарослях инвазивных видов *Acer negundo* и *Sorbaria sorbifolia* // РЖБИ. 2021. № 4. С. 30–42.
17. Veselkin D.V., Dubrovin D.I., Pustovalova L.A. High canopy cover of invasive *Acer negundo* L. as a mechanism of its influence on ground cover plants // Scientific Reports. 2021. Vol. 11, № 1. P. 20758.
18. Konvalinková T., Jansa J. Lights off for arbuscular mycorrhiza: on its symbiotic functioning under light deprivation // Frontiers in Plant Science. 2016. Vol. 7. P. 1–11.

OCCURRENCE OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL HERBS IS SELECTIVELY DECREASED IN COMMUNITIES INVADED BY ALIEN TREE *ACER NEGUNDO*

D. V. Veselkin^{1, #}, D. I. Dubrovin¹, O. S. Rafikova¹

¹The Institute of Plant and Animal Ecology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
Yekaterinburg, Russian Federation

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

Presented by Academician of the RAS V.N. Bolshakov

We tested whether one of the consequences of alien plant invasion predicted by the mutualism disruption hypothesis was true in regard to ash-leaved maple (*Acer negundo* L.). The study aimed to determine whether the occurrence of mycorrhizal and non-mycorrhizal herbs varied similarly or differently in communities with different degrees of *A. negundo* dominance. We analysed the results of 78 relevés carried out in the Belarusian Polesie, the Middle Volga region and the Middle Urals. In each region, communities with dominance of *A. negundo* and without it were described. The mycorrhizal status of plant species was determined using the FungalRoot Database. It was found, with an increase in probability of arbuscular mycorrhiza formation, the frequency of those species' registration was decreased in *A. negundo* thickets. On the contrary, with an increase in probability of non-mycorrhizal status, the frequency of those species' registration was increased in *A. negundo* thickets. Therefore, in communities dominated by *A. negundo*, the occurrence of arbuscular mycorrhizal herbs was selectively decreased.

Keywords: plant invasions, mechanisms of invasions, mutualism disruption, degraded mutualism hypothesis, plant communities, types of plant nutrition, functional diversity, plant traits

УДК 577.29

ПОЛУЧЕНИЕ КРОЛИКОВ С НОКАУТОМ ГЕНА *LEPR* С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9

© 2024 г. Ю. Ю. Силаева¹, П. Д. Сафонова², Д. В. Попов³, М. А. Филатов¹, Ю. Д. Окулова¹,
Р. А. Шафеев⁴, О. И. Скобель³, Д. Э. Высоцкий³, Ю. Д. Губарев⁵, В. И. Глазко³,
Т. Т. Глазко³, академик РАН П. Г. Георгиев², Г. Ю. Косовский³, М. В. Шепелев^{1, *}

Поступило 25.05.2024 г.

После доработки 25.06.2024 г.

Принято к публикации 30.06.2024 г.

Мутации в гене *LEPR*, кодирующем рецептор гормона лептина, у человека приводят к развитию морбидного ожирения, нарушению обмена липидов, дефектами фертильности. У грызунов описаны спонтанные мутации в гене *LEPR*, а также получены животные с нокаутом *LEPR*, в том числе с помощью системы CRISPR/Cas9. Особенности липидного обмена у грызунов существенно отличаются от таковых у человека или кроликов, поэтому наиболее релевантной моделью нарушений липидного обмена и морбидного ожирения являются кролики, однако до настоящего времени не сообщалось о получении кроликов с нокаутом гена *LEPR*. В данной работе с помощью системы CRISPR/Cas9 за счет внесения делеции в области 10 экзона был получен кролик с нокаутом гена *LEPR*. Показано, что вес нокаутного кролика был существенно выше среднего веса кроликов дикого типа. Технология получения кроликов с нокаутом *LEPR* с помощью CRISPR/Cas9 позволит создать модель морбидного ожирения и эндокринных нарушений, обусловленных мутациями в гене рецептора лептина человека.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, *LEPR*, лептин, генетически модифицированный кролик

DOI: 10.31857/S2686738924050071

Пептидный гормон лептин (16 кДа) продуцируется белой жировой тканью (относится к адипокинам) и регулирует пищевое поведение, энергообмен и множество других нейроэндокринных функций [1]. Эффекты лептина реализуются за счет связывания с трансмембранным рецептором, кодируемым геном *LEPR*, и относящимся к семейству gp130 рецепторов цитокинов [2]. Основные эффекты лептина опосредованы активацией JAK-STAT сигнального пути, а также таких

сигнальных белков как SOCS3, PTP1b, MAP-киназы и IRS (субстрат инсулинового рецептора) [2]. Длинная форма рецептора состоит из трех доменов — внеклеточного, трансмембранного и внутриклеточного. Описана растворимая изоформа рецептора лептина, представляющая собой отщепленную внеклеточную часть рецептора, циркулирующую в крови и играющую роль лептин-связывающего белка [3]. Показано, что взаимодействие лептина с его рецептором необходимо для регуляции аппетита, расхода энергии, поддержания гомеостаза глюкозы и фертильности. У человека описано более 50 клинических случаев ожирения, обусловленного мутациями в гене *LEPR* [4]. Созданы генетически модифицированные грызуны с нокаутом гена *LEPR*, однако их фенотип не вполне совпадает с симптомами, наблюдаемыми у людей [5]. Известно об участии лептина в индукции и регуляции хронических воспалительных процессов, дегенеративных заболеваний, аутоиммунных патологий, диабета 2-го типа и рака [6]. Кроме того, лептин регулирует репродуктивные функции, а у самок мышей с тканеспецифическим нокаутом *LEPR* в репродуктивной системе нарушается фертильность [7].

¹Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

²Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

³Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева, пос. Родники, Московская область, Россия

⁴Московский Государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵Белгородский государственный национальный университет, Белгород, Россия

*e-mail: mshepelev@mail.ru

Однако весь спектр эффектов, связанных с активацией/ингибированием лептиновых рецепторов, изучен пока недостаточно.

Мыши линий (*diabetes/db*) и (*obese/ob*) с фенотипом, характеризующимся метаболическими нарушениями, гипергликемией, ожирением и симптомами диабета, были описаны в 60-70-е годы XX века [8]. Впоследствии было установлено, что фенотип *ob/ob* обусловлен мутацией в гене лептина [9], а фенотип *db/db* — мутацией в гене *LEPR* [10]. Показано, что у таких мышей инсерция длиной 106 п.о. между 18 и 19 экзонами приводит к формированию укороченного нефункционального белка [10]. С помощью технологии классического нокаута генов были получены мыши с Cre-индуцибельным нокаутом *LEPR* за счет делеции первого или 17 экзонов [11, 12]. На основе этих линий получали животных с нокаутом *LEPR* в различных тканях (в нейронах, печени, поджелудочной железе, жировой ткани, клетках эндотелия и др.) [12–16]. Было показано, что именно действие лептина на рецептор *LEPR* в гипоталамусе, но не в других тканях, регулирует аппетит у экспериментальных животных [12]. Спонтанная мутация в гене *LEPR*, приводящая к ожирению, была описана и у крыс (линия Zucker или *fatty* (*fa/fa*)) [17]. Кроме того, появление технологий геномного редактирования позволило получить крыс с нокаутом *LEPR* с помощью системы CRISPR/Cas9 за счет внесения инделов в 4 экзоне гена [18]. Однако оказалось, что фенотип грызунов с мутациями в гене *LEPR* не вполне совпадает с симптомами, наблюдаемыми у людей [5]. Это может быть связано с тем, что у мышей, помимо ряда других особенностей, в отличие от человека и кроликов, холестерин в плазме крови преимущественно связан с липопротеинами высокой плотности, что приводит к резистентности мышей к развитию атеросклероза. Таким образом, моделирование нарушений липидного обмена, наиболее актуально именно на моделях генно-модифицированных кроликов, а не мышей [19]. Кролики с нокаутом гена *LEPR* до настоящего времени описаны не были, поэтому целью данной работы было создание кроликов с нокаутом гена *LEPR* с помощью технологии CRISPR/Cas9.

Ген *LEPR* кролика локализован на 13 хромосоме, содержит 28 экзонов, включая альтернативные. Известно 14 изоформ транскрипта *LEPR*, кодирующих 5 изоформ белка. Гидовую РНК для нуклеазы SpCas9 выбирали с помощью ресурса ChopChop (<https://chopchop.cbu.uib.no/>), используя в качестве запроса нуклеотидную последовательность одного из самых длинных транскриптов гена *LEPR* (XM_051856399, транскрипт вариант 8, кодирует белок изоформы X1, и состоит из 21 экзона). В результате были выбраны две гидовые РНК с наивысшим рангом (GCTGACACGATCATTACACAACGG; sgLepr-1)

и (ATAATTCCGCATAGCGATGATGG; sgLepr-2), комплементарные мишеням в 10 экзоне гена *LEPR*, которые присутствуют во всех изоформах транскрипта.

Далее, для выявления возможных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP, single nucleotide polymorphism) амплифицировали участок генома кролика, включающий 10 экзон гена *LEPR*, в котором находятся мишени для гидовых РНК. Геномную ДНК из тканей кролика породы советская шиншилла выделяли с помощью набора реагентов GeneElute Mammalian genomic DNA Miniprep Kit (“Sigma-Aldrich”, США, G1N350) и фрагмент длиной 642 п.о. амплифицировали в реакции объемом 25 мкл, содержащей 1-х кратный мастермикс PrimeSTAR® HS (“TakaraBio”, Япония, R040), 160 нМ прямого (“F”, 5-gtctttatctgatctctgcttt-3) и обратного (“R”, 5-gttagctcactataccsacaga-3) праймеров, и 20 нг геномной ДНК при следующих условиях: +94°C — 3 мин; 35х циклов +94°C — 30 с, +62°C — 30 с, +72°C — 45 с; +72°C — 3 мин, +4°C — постоянно. Продукт ПЦР очищали из реакционной смеси с помощью набора реагентов DNA Clean & Concentrator-25 (“Zymo Research”, США, D4034) и секвенировали по Сэнгеру используя праймер “F”. Было обнаружено, что мишень для гидовой РНК sgLepr-1 содержит два SNP: C/G во второй позиции протоспейсера и G/A в РАМ-сайте (данные не показаны), а мишень для гидовой РНК sgLepr-2 — один SNP A/T в 20-м положении протоспейсера (рис. 1А). На основании этих результатов для получения кроликов с нокаутом гена *LEPR* была выбрана гидовая РНК sgLepr-2, так как в геноме присутствует один SNP, и, значит, как минимум один аллель будет эффективно разрезаться нуклеазой SpCas9.

Далее получали гидовую РНК sgLepr-2 для микроинъекций в зиготы. Вначале на основе плазмиды pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (далее — pX300; Addgene #42230), конструировали плазмиду pX330-sgLepr-2. Для этого одноцепочечные синтетические олигонуклеотиды (“Евropen”, Россия) 5-caccgataattccgcatacgatga-3 и 5-aaactcatcgctatgcggaattatc-3 гибридизовали для формирования двуцепочечных олигонуклеотидов и клонировали в вектор pX330 по сайту BbsI. Далее, получали ДНК-матрицу для транскрипции *in vitro* (IVT), амплифицируя на матрице плазмиды pX330-sgLepr-2 фрагмент длиной 122 п.о. с праймерами 5-tgtaatacagactcactataggataattccgcatacgatga-3 и 5-aaaagcaccgactcggtgcc-3 в реакции объемом 50 мкл, содержащей 1-кратный премикс PrimeSTAR® HS, праймеры в концентрации 200 нМ и 1 нг плазмиды pX330-sgLepr-2. Реакцию проводили при следующих условиях: +95°C — 2 мин; 5х циклов: +95°C — 15 с, +72°C — 20 с; 5х циклов: +95°C — 15 с, +66°C — 10 с, +72°C — 20 с; 25х циклов: +95°C — 15 с, +63°C — 10 с, +72°C — 20 с;

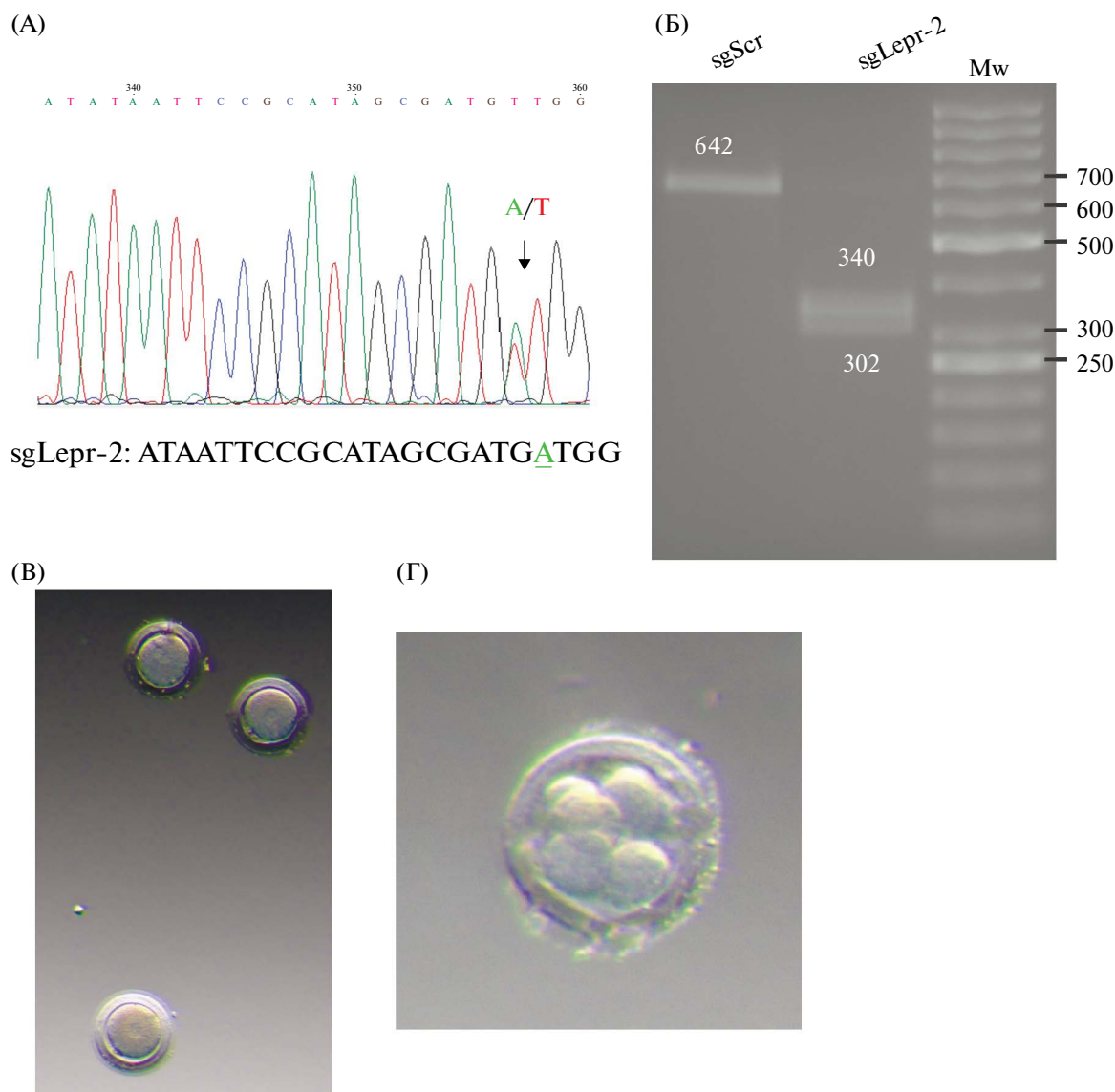


Рис.1. Разработка технологии нокаута гена *LEPR* кроликов с помощью системы CRISPR/Cas9. (а) Результаты секвенирования по Сэнгеру мишени для sgLepr-2 в геноме кролика. SNP A/T в 20 позиции протоспейсера указан стрелкой. Снизу от хроматограммы приведена нуклеотидная последовательность мишени для sgLepr-2, включающая протоспейсер и сайт PAM. (б) Результаты *in vitro* теста на расщепление ДНК-субстрата. Продукт ПЦР длиной 642 п.о. инкубировали с SpCas9 РНП, содержащим sgLepr-2 или контрольную геновую РНК, не имеющую мишеней в геноме кролика (sgScr). Расщепление ДНК-субстрата с образованием фрагментов ожидаемого размера (340 и 302 п.о.) отмечалось только под влиянием sgLepr-2. Дорожка “Mw” – маркер длины фрагментов ДНК – O’GeneRuler 50bp DNA Ladder (“Thermo Scientific”, SM1133). Длина некоторых полос маркера обозначена справа от рисунка. Фото эмбрионов кролика до проведения микроинъекций (в) и через 120 часов после микроинъекций смеси реагентов для геномного редактирования (г). Снимки эмбрионов, находящихся в чашках Петри в культуральной среде, получали с помощью микроскопа Nikon SMZ-800 (Япония).

+72°C – 10 мин, +4°C – постоянно. Продукт ПЦР очищали, используя набор реагентов MinElute® Reaction Cleanup Kit (“Qiagen”, Германия, 28204) и определяли его концентрацию с помощью спектрофотометра Nanophotometer ND-120 (“Implen”, Германия). Концентрация ПЦР матрицы для IVT составляла 29 нг/мкл.

Далее проводили реакцию IVT объемом 20 мкл, используя набор реагентов HiScribe® T7 High Yield RNA Synthesis Kit (“New England Biolabs”, США, 02040S) в соответствии с протоколом для коротких РНК транскриптов длиной менее 300 п.о. и содержащую 15.2 нг/мкл ПЦР-матрицы. Реакцию инкубировали при +37°C

в течение 5 часов, после чего добавляли 1 мкл фермента TURBO DNase, 2 ед./мкл (“Ambion”, Литва, AM2238) для разрушения ДНК-матрицы и инкубировали при +37°C в течение 20 мин. Синтезированную в реакции транскрипции гидовую РНК очищали из реакционной смеси с помощью набора реагентов miRNeasy Mini Kit (“Qiagen”, 217004) и хранили в аликвотах при –80°C.

Оценку активности гидовой РНК sgLepr-2 проводил с помощью *in vitro* теста на расщепление субстрата с рибонуклеопротеиновым комплексом (РНП). Рекombинантный белок SpCas9 получали как описано в [20]. Нуклеазу SpCas9 и гидовую РНК sgLepr-2 разводили до концентрации 3 мкМ в однократном буфере “Orange” (“Thermo Scientific”, BO5), и свободной от нуклеаз воде (“Ambion”, AM9937) соответственно. Объем реакции *in vitro* теста на расщепление составлял 30 мкл и включал 150 нМ белка SpCas9, 150 нМ sgLepr-2 или контрольной гидовой РНК, не имеющей мишеней в геноме кролика (sgScr, протоспейсер: 5-gcactaccagagctaaactca-3), и 3.5 нг/мкл ДНК-субстрата (продукт ПЦР длиной 642 п.о., амплифицированный на матрице геномной ДНК кролика породы советская шиншилла, как описано выше) в 1-х кратном буфере “Orange”. Вначале для сборки РНП смешивали SpCas9 и гидовую РНК и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Далее, добавляли 3 мкл ДНК-субстрата и инкубировали реакцию при +37°C в течение 30 мин. Затем для разрушения гидовой РНК добавляли 1 мкл РНКазы (10 мкг/мкл) и инкубировали реакцию 10 мин при +37°C, после чего для разрушения белка SpCas9 и высвобождения ДНК-субстрата из комплекса с РНП добавляли 1 мкл протеиназы К (20 мкг/мкл) и инкубировали реакцию при +56°C в течение 10 мин. Полученные образцы разделяли в 2%-ом ТАЕ-агарозном геле. Результаты *in vitro* теста на расщепление субстрата с РНП показаны на рис. 1Б. В результате было обнаружено, что гидовая РНК sgLepr-2, но не контрольная выроденная гидовая РНК (sgScr) вызывает расщепление ПЦР-продукта длиной 642 п.о. на два фрагмента ожидаемого размера 302 и 340 п.о. (рис. 1Б), что свидетельствует о пригодности полученной гидовой РНК для внесения двучепочечных разрывов ДНК в гене *LEPR* кролика в месте, определяемом последовательностью гидовой РНК sgLepr-2.

Далее, для получения зигот кроликов, самок-доноров породы советская шиншилла осеменяли методом естественной случки, через 16–18 часов животных забивали и отбирали матку, яйцеводы и яичники. Зиготы из яйцеводов извлекали с помощью промычного раствора $t = +25\text{--}29^\circ\text{C}$ (среда Хэнкса “ПанЭко”, Р020п, Россия, с добавлением гентамицина (ОАО “Дальхимфарм”, Россия, 800х раствор) и 2%-ой фетальной бычьей сыворотки

(ФБС) (“Cytiva”, США)), который вводили в отпрепарированный яйцевод со стороны рога матки с помощью шприца. Промычный раствор собирали в чашку Петри, фильтровали через фильтровальную систему для эмбрионов Miniflush® (“Minitube”, Германия) и проводили поиск зигот с помощью микроскопа при 150–200-х-кратном увеличении. Обнаруженные зиготы с помощью пластикового капилляра помещали в среду DMEM/F12 (“ПанЭко”, Россия) с добавлением 10%-ой ФБС и пенициллина (100 ед./мл), и стрептомицина (100 мкг/мл) под минеральным маслом (“Origio”, Дания). Далее в зиготы инъецировали компоненты системы CRISPR/Cas9 (как описано ниже) для оценки эффективности редактирования локуса *LEPR* с помощью гидовой РНК sgLepr-2 и культивировали в течение 120 ч. На рис. 1В показаны зиготы кролика до проведения микроинъекций, а на рис. 1Г — через 120 ч после микроинъекций. Инъецированные зиготы культивировали в течение 120 ч после чего анализировали на предмет редактирования гена *LEPR*. Для этого эмбрионы лизировали как описано в [21] и амплифицировали фрагмент генома длиной 642 п.о. с праймерами “F” и “R” с помощью набора реагентов GenPak PCR Core (“Лаборатория Изоген”, U 1010-08, Россия) в реакции объемом 20 мкл при следующих условиях: +94°C – 2 мин; 40х циклов: +94°C – 30 с, +62°C – 30 с, +72°C – 45 с; +72°C – 2 мин. Далее, для выявления отредактированных эмбрионов проводили гетеродуплексный анализ. Для этого продукты ПЦР инкубировали при +95°C в течение 5 мин и далее охлаждали до комнатной температуры со скоростью 2°C в секунду с +95°C до +85°C и со скоростью 0.1°C в секунду от +85°C до +25°C. После этого 5 мкл реакционной смеси разделяли в 8%-ом ТВЕ-полиакриламидном геле. Наличие редактирования определяли по появлению дополнительных полос в геле по сравнению с образцами, амплифицированными на матрице геномной ДНК из неинъецированных зигот (wt). На рис. 2А показаны результаты гетеродуплексного анализа шести инъецированных эмбрионов (1–6). Для образца #5 не удалось амплифицировать фрагмент ДНК в достаточном количестве. Во всех остальных образцах были обнаружены дополнительные полосы в геле, отсутствующие в образцах дикого типа и свидетельствующие о формировании гетеродуплексов. Поэтому далее для подтверждения редактирования локуса *LEPR* было проведено секвенирование продуктов ПЦР по Сэнгеру с праймером “F”, а также анализ результатов секвенирования с помощью он-лайн инструмента ICE Analysis (“Synthego”, США, <https://ice.synthego.com/>). В результате было установлено, что в эмбрионах #2 и #3 произошло CRISPR/Cas9 – опосредованное редактирование (рис. 2Б и В). При этом по результатам ICE анализа частота инделов составляла 89%

и 92%, что свидетельствует об эффективном редактировании обеих аллелей целевого локуса уже на стадии 1–2-клеточного эмбриона. Образец #1 был дикого типа, в образцах #4 и #6 был выявлен полиморфизм А/Т (данные не показаны), присутствующий геномной мишени для sgLepr-2 (рис. 1А), что, по всей видимости, и привело к формированию дополнительных полос в геле при гетеродуплексном анализе (рис. 2А). Интересно отметить, что в двух отредактированных образцах был выявлен генотип А/А (рис. 2Б), тогда как в трех нередактированных эмбрионах были выявлены генотипы А/А, А/Т и Т/Т (данные не показаны). Хотя полученный результат не является статистически значимым, тем не менее, он указывает на то, что, как и ожидалось, возможно редактирование только аллеля гена *LEPR*, несущего генотип А, и, кроме того, указывает на важность секвенирования геномных мишеней для гидовых РНК у экспериментальных животных. Резюмируя, нами были получены реагенты для эффективного CRISPR/Cas9-опосредованного редактирования гена *LEPR* кролика.

Далее для получения кроликов с нокаутом гена *LEPR* проводили микроинъекции компонентов системы редактирования генома в виде смеси мРНК нуклеазы SpCas9 (25 нг/мкл, “TriLink Biotechnologies”, США, L-7206) и гидовой РНК sgLepr-2 (7.5 нг/мкл) в буфере TE (10 мМ Трис HCl pH 7.4, 0.1 мМ ЭДТА) в цитоплазму полученных зигот в среде Ооклин (“ПанЭко”) под контролем микроскопа Zeiss Axiovert 200M при увеличении 400X, с помощью микроманипуляторов Narishige (Япония) и инъектора Eppendorf FemtoJet (“Eppendorf”, Франция). Для изготовления игл для микроинъекций использовали пуллер Sutter instrument Co P-97 (США), для изготовления удерживающей пипетки использовали пуллер Narishige PC-10 (Япония) и микрокузницу Narishige MF-900 (Япония). Выжившие после микроинъекций зиготы помещали в среду DMEM/F12 с 10%-ой ФБС (см. выше) и культивировали при +38.5°C, 100% влажности и 7% CO₂ в течение 24-х часов до пересадки реципиентам.

Далее, для пересадки эмбрионов в качестве самок-реципиентов отбирали здоровых половозрелых

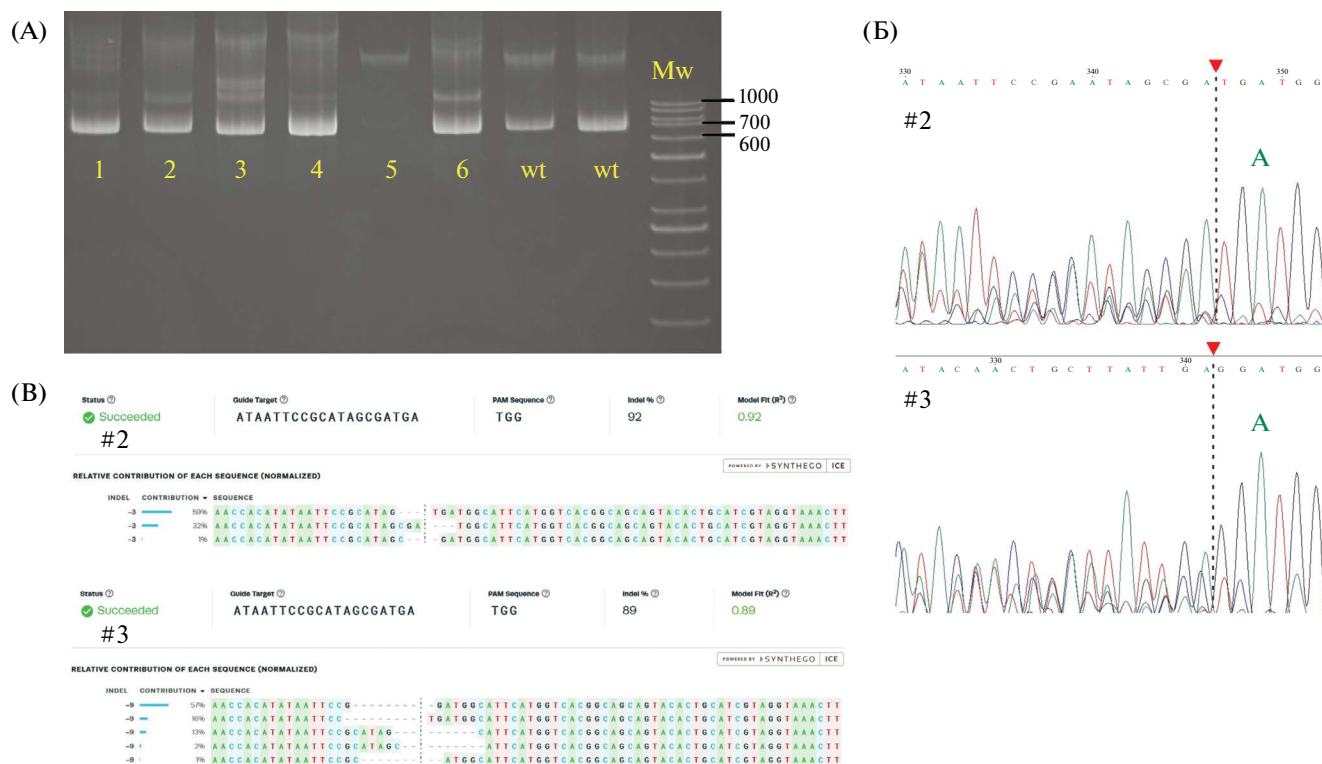


Рис. 2. Эффективное редактирование гена *LEPR* в эмбрионах кролика. (а) Результаты гетеродуплексного анализа продуктов амплификации на матрице геномной ДНК из шести эмбрионов кролика (1–6), инъектированных смесью мРНК SpCas9 и sgLepr-2. 5 мкл реакции ПЦР разделяли в 8%-ом полиакриламидном геле. Дорожка “Mw” — маркер длины фрагментов ДНК — O’GeneRuler 50bp DNA Ladder. Длина некоторых полос маркера обозначена справа от рисунка. (б) Результаты секвенирования по Сэнгеру образцов #2 и #3. Вертикальная пунктирная черта и красный треугольник указывают место разрезания генома нуклеазой SpCas9. Генотип SNP (А) показан над пиком хроматограммы. (в) Результаты ICE анализа хроматограмм секвенирования по Сэнгеру образцов #2 и #3. Нуклеотидные последовательности показывают выявленные инделы. Частоты инделов составляли 92% и 89% для образцов #2 и #3, соответственно.

самок породы белый великан, у которых индуцировали овуляцию за 15–24 часа до пересадки с помощью гонадотропин-рилизинг-фактора (препарат Сурфагон, АО “Мосагроген”, Россия) в дозе 1 мкг на животное. Доступ к яйцеводам обеспечивали лапаротомией и вводили инъецированные эмбрионы в воронку яйцевода самки-реципиента. Для анестезии и наркоза использовали препараты новокаин 0.5 % (“Solopharm”, Россия) и Пропофол Каби (“Fresenius Kabi”, Германия) согласно инструкции производителя. В качестве сред для трансплантации использовали среды Spermwash (“Gynotec”, Канада) или Ооклин (“ПанЭко”).

Для получения новорожденных кроликов через 30 суток после трансплантации эмбрионов проводили кесарево сечение. Для анестезии и наркоза использовали препараты как описано выше. Доступ к матке обеспечивали лапаротомией, после чего вскрывали рог матки, содержащий эмбрионы, и извлекали плоды. Далее проводили экстирпацию матки, убеждались, что нет кровотечения, и послойно зашивали рану. Полученных крольчат помещали к заранее подготовленной кормилице.

В общей сложности, в ходе двух экспериментов было получено и микроинъецировано 36 эмбрионов на стадии двух пронуклеусов, из которых 32 дробились через 24 ч после микроинъекций. Реципиенту #1 было пересажено 22 эмбриона (по 11 в каждый яйцевод), а реципиенту #2 было пересажено 10 эмбрионов (по 5 в каждый яйцевод). В результате реципиент #1 погибла от инфекционных осложнений после трансплантации, а у реципиента #2 развилась беременность и с помощью кесарева сечения был получен один живой крольчонок (самка).

Для генотипирования новорожденного кролика геномную ДНК из ткани уха выделяли как описано в [22] и амплифицировали фрагмент длиной 642 п.о., содержащий мишень для гидовой РНК sg-Lepr-2, как описано выше, используя в качестве отрицательного контроля геномную ДНК кролика дикого типа. Анализ продуктов ПЦР с помощью электрофореза в 8%-ом акриламидном геле показал, что на матрице геномной ДНК новорожденного кролика (рис. 3А, дорожка “КО”) помимо фрагмента длиной 642 п.о., соответствующего геному дикого типа, амплифицируется фрагмент длиной около 350 п.о., присутствующий только в образце “КО”. Далее продукты ПЦР очищали из агарозного геля с помощью набора реагентов QIAEX II (“Qiagen”, #20021) и секвенировали по Сэнгеру используя праймер “F”. В результате, было обнаружено, что нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК длиной 642 п.о. соответствует геному кролика дикого типа (данные не показаны), а короткий продукт ПЦР в образце “КО” длиной 356 п.о. образовался в результате делеции длиной 295 п.о. и инсерции случайных 9 п.о. ТТТАААГТА (рис. 3В). Интересно отметить, что в ПЦР продукте

дикого типа SNP в мишени для sgLepr-2 был представлен генотипом Т, что и объясняет отсутствие редактирования в данном аллеле.

Таким образом, с помощью системы CRISPR/Cas9 был получен генно-модифицированный кролик, несущий делецию в геноме в области 10 экзона гена *LEPR*. Схема геномного локуса *LEPR* дикого типа (“wt”) и локуса с делецией в области 10-го и 11-го экзонов (“КО”) показана на рис. 3Б. Анализ нуклеотидной последовательности короткого ПЦР продукта показал, что в результате делеции утрачиваются 58 п.о. экзона 10, полный интрон 10 длиной 144 п.о. и часть экзона 11 длиной 93 п.о., тем самым приводя к формированию в геноме гибридного экзона между 5'-областью 10-го экзона и 3'- областью 11-го экзонов (рис. 3Б). Сплайсинг такого гибридного экзона с высокой вероятностью будет идти с использованием акцепторного сайта 10-го экзона и донорного сайта 11-го экзонов гена *LEPR*. Анализ нуклеотидной последовательности транскрипта гена *LEPR* (XM_051856399) показал, что в результате делеции возникает преждевременный стоп-кодон (Рис. 3В), и с такого транскрипта, начиная с кодона инициации трансляции ATG во втором экзоне гена *LEPR*, будут транслироваться 450 N-концевых аминокислотных остатков белка *LEPR*, за которыми в одной рамке считывания будет транслироваться бессмысленный пептид FKVVPCS, после чего трансляция белка будет обрываться за счет кодона терминации трансляции TGA (рис. 3В). Таким образом, результаты молекулярно-генетического анализа указывают на то, что внесенная с помощью CRISPR/Cas9 делеция действительно приведет к синтезу укороченного нефункционального белка и, как следствие, к нокауту гена *LEPR*.

Как правило, животные поколения F0 являются мозаичными и несут в геноме несколько модифицированных аллелей. Как видно из рис. 3А, на матрице геномной ДНК из тканей кролика с нокаутом амплифицируется только два продукта ПЦР, и секвенирование по Сэнгеру длинного продукта не выявило присутствия дополнительных модифицированных аллелей. Таким образом, полученный с помощью геномного редактирования кролик с высокой вероятностью является гетерозиготным по нокаутному аллелю.

Основным проявлением фенотипа нокаута *LEPR* является морбидное ожирение. Интересно отметить, что уже при рождении вес крольчонка (104 г) был примерно в два раза выше нормального веса новорожденного крольчонка породы советская шиншилла (около 60 г). Далее проводился мониторинг веса крольчонка с нокаутом *LEPR* в сравнении со средним весом крольчат дикого типа такой же породы, который известен из справочных данных [23], так как было невозможно сравнить вес с крольчатами дикого типа из того же помета. Как видно из рис. 4Б, вес нокаутного

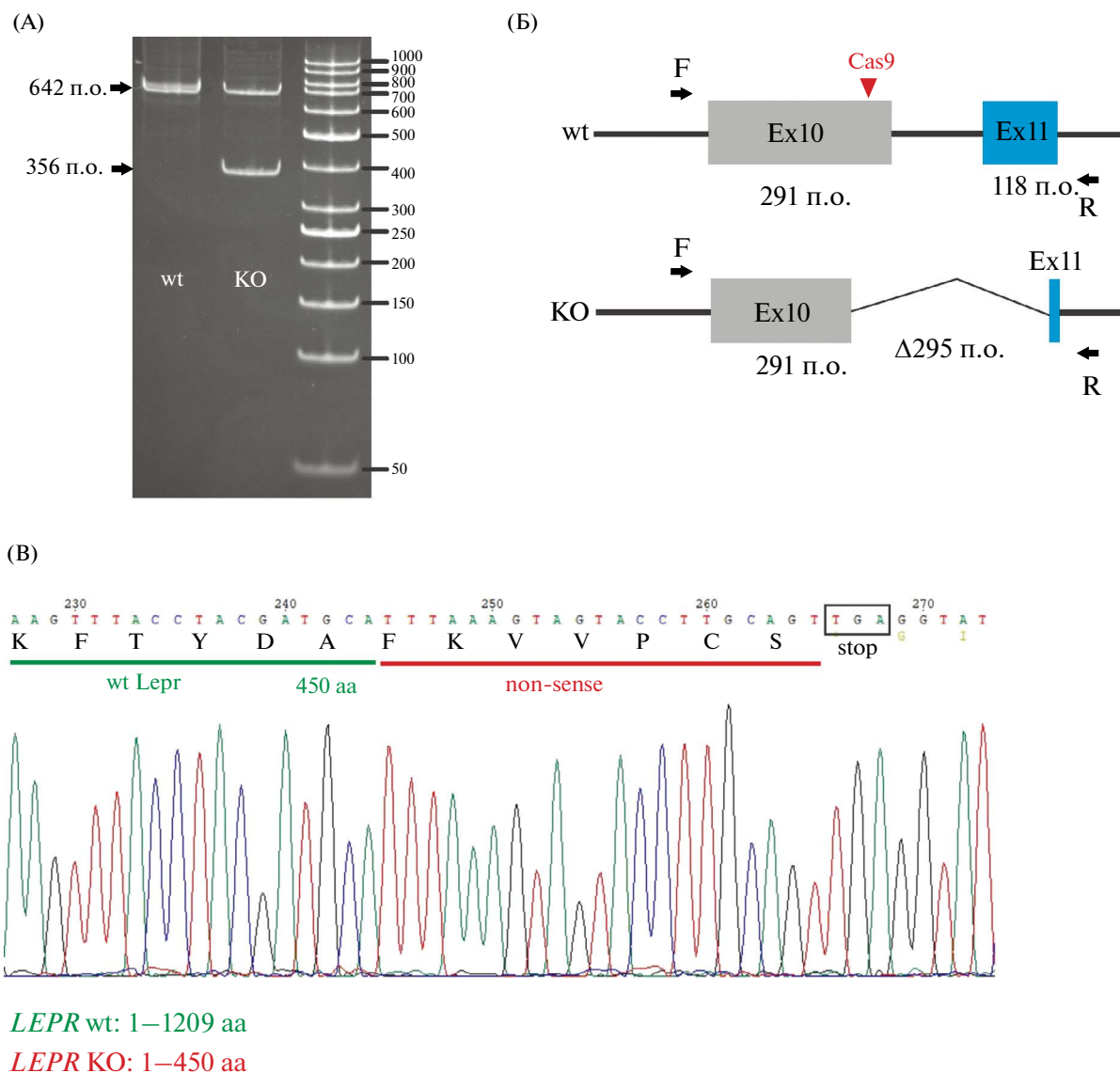


Рис. 3. Молекулярно-генетический анализ кролика с нокаутом *LEPR*. (а) Анализ продуктов ПЦР, амплифицированных на матрице геномной ДНК кролика дикого типа (дорожка wt) и с нокаутом гена *LEPR* (дорожка «КО»), с помощью электрофореза в 8%-ом акриламиде геле. Полоса длиной 642 п.о. амплифицируется на матрице геномной ДНК дикого типа; полоса длиной 356 п.о. присутствует только в образце «КО». Длины полос маркера молекулярного веса ДНК O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder ("ThermoFisher Scientific", США) указаны справа. Положение соответствующих продуктов ПЦР указано стрелками. (б) Схема геномного локуса *LEPR* дикого типа (wt) в области 10 и 11 экзонов, имеющих длину 291 и 118 п.о. соответственно. Положение олигонуклеотидных праймеров "F" и "R" показано в виде стрелок. На панели "КО" показана схема геномного локуса *LEPR* генно-модифицированного кролика. Место внесения двуцепочечного разрыва в геноме кролика с помощью нуклеазы SpCas9 и гидовой РНК sgLepr-2 показано красным треугольником. (в) Результат секвенирования по Сэнгеру продукта ПЦР длиной 356 п.о. Под нуклеотидной последовательностью указана транслация открытой рамки считывания транскрипта XM_051856399, транскрибирующегося с нокаутного аллеля. С 1 по 450 аминокислоту транслируется последовательность белка *LEPR* дикого типа (подчеркнуто зеленым), далее за счет инсерции случайных 9 п.о. ТТТAAAGТА транслируется бессмысленный пептид FKVVPСS (non-sense, подчеркнут красным), после чего следует кодон терминации транслации TGA (показан рамкой).

крольчонка был существенно выше по сравнению с весом крольчат дикого типа такой же породы и возраста, что указывает на развитие морбидного ожирения у крольчонка с нокаутом *LEPR*.

По достижении половозрелости (в возрасте 6 месяцев) для получения животных поколения F1 самку с нокаутом *LEPR* спарили с самцом той же породы. Однако, крольчиха погибла во время

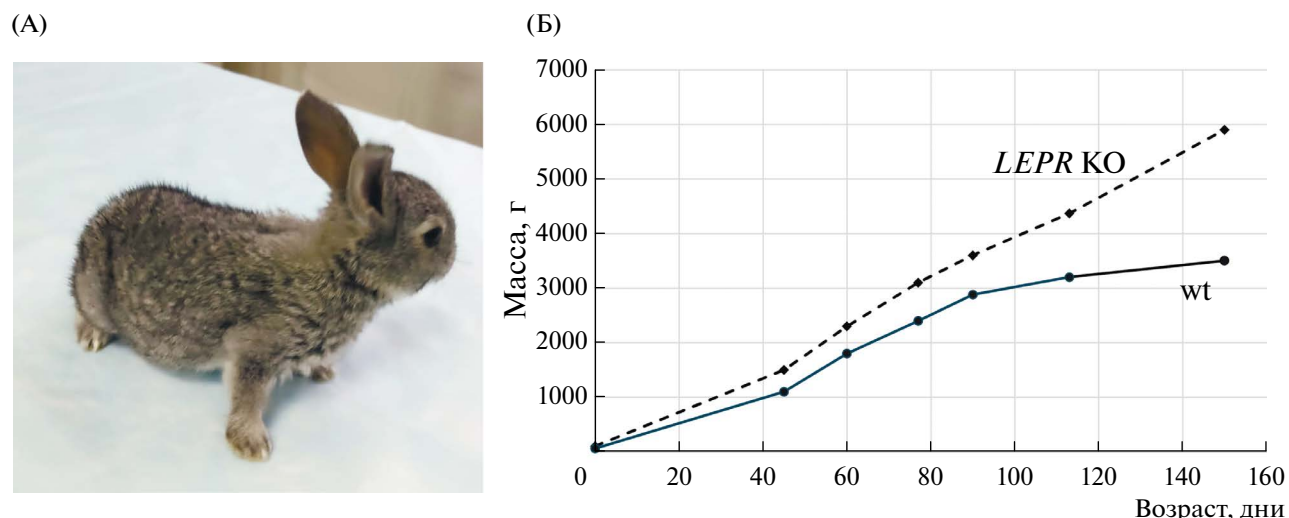


Рис. 4. Динамика набора массы тела кроликом с нокаутом гена *LEPR*. (а) Фото генно-модифицированного кролика в возрасте около двух недель. (б) График набора массы тела кроликом с нокаутом гена *LEPR* (“*LEPR KO*”) по сравнению со средней массой тела кроликов породы советская шиншилла дикого типа (“*wt*”).

беременности от пневмонии. При вскрытии в матке было обнаружено 9 имплантировавшихся плодов. В результате генотипирования было установлено, что 5 из 9 плодов несут нокаутный аллель (данные не показаны). Таким образом, показана возможность вертикальной передачи внесенной генетической модификации от матери к потомству. Известно, что нокаут *LEPR* может влиять на родовую активность животных и приводить к мертворождению [7], однако из-за гибели самки проверить это экспериментально оказалось невозможно. Тем не менее, можно сделать вывод о том, что инактивация одного аллеля гена *LEPR* не влияет на имплантацию эмбрионов.

Таким образом, с помощью CRISPR/Cas9-опосредованного геномного редактирования за счет внесения делеции в области 10 экзона нами впервые был получен кролик с нокаутом гена *LEPR*. Стоит отметить, что наличие стоп-кодона ближе к 5'-области транскрипта с большой вероятностью будет приводить к деградации такого транскрипта по механизму нонсенс-опосредованного распада мРНК. Даже если такой аберрантный транскрипт будет экспрессироваться на достаточно высоком уровне, то укороченный до 450 а.о. белок будет лишен трансмембранного домена и не будет заякорен в плазматической мембране, а также не сможет действовать как растворимая форма *LEPR*, так как будет лишен функциональных CRH2 доменов (428-641 а.о.), связывающих лептин [3]. Таким образом, с точки зрения локализации внесенного генетического дефекта данная модель существенно отличается от всех ранее описанных моделей нокаута гена у млекопитающих. Показано, что вес нокаутного крольчонка был существенно

выше среднего веса крольчат дикого типа той же породы, что указывает на развитие морбидного ожирения у животного с нокаутом *LEPR*. Разработанная нами технология получения генно-модифицированных кроликов с нокаутом *LEPR* с помощью системы CRISPR/Cas9 позволит создать модель морбидного ожирения и метаболических нарушений, обусловленных мутациями в гене рецептора лептина.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства Науки и Высшего образования Российской Федерации в рамках Соглашения № 075-15-2019-1661 от 31.10.2019, государственного задания ФГБНУ НИИПЗК № 075-00503-24-01 от 05.04.2024.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с рекомендациями Комиссии по биоэтике Института биологии гена РАН, на проведение экспериментов было получено разрешение Комиссии по биоэтике ИБГ РАН №10 от 15.02.2023.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Коллективом авторов подана патентная заявка № 2023134478 от 21.12.2023 “Способ получения генно-модифицированных кроликов с нокаутом гена *LEPR* с помощью системы CRISPR/Cas9”.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с использованием инфраструктуры Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Института биологии гена РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алипкина С.И. *et al.* Лептин и его рецептор в норме и при патологии // Успехи Современной Биологии. 2019. Vol. 139. P. 352–364.
2. Friedman J.M. Leptin and the endocrine control of energy balance // Nat Metab. 2019. Vol. 1, № 8. P. 754–764.
3. Schaab M., Kratzsch J. The soluble leptin receptor // Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2015. Vol. 29, № 5. P. 661–670.
4. Berger C., Klöting N. Leptin Receptor Compound Heterozygosity in Humans and Animal Models // Int J Mol Sci. 2021. Vol. 22, № 9. P. 4475.
5. Israel D., Chua S. Leptin receptor modulation of adiposity and fertility // Trends Endocrinol Metab. 2010. Vol. 21, № 1. P. 10–16.
6. Iikuni N. *et al.* Leptin and Inflammation // Curr Immunol Rev. 2008. Vol. 4, № 2. P. 70–79.
7. Pennington K.A. *et al.* Conditional knockout of leptin receptor in the female reproductive tract reduces fertility due to parturition defects in mice // Biol Reprod. 2022. Vol. 107, № 2. P. 546–556.
8. Coleman D.L. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice // Diabetologia. 1978. Vol. 14, № 3. P. 141–148.
9. Zhang Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue // Nature. 1994. Vol. 372, № 6505. P. 425–432.
10. Chen H. *et al.* Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice // Cell. 1996. Vol. 84, № 3. P. 491–495.
11. McMinn J.E. *et al.* An allelic series for the leptin receptor gene generated by CRE and FLP recombinase // Mamm Genome. 2004. Vol. 15, № 9. P. 677–685.
12. Cohen P. *et al.* Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity // J Clin Invest. 2001. Vol. 108, № 8. P. 1113–1121.
13. McMinn J.E. *et al.* Neuronal deletion of *Lepr* elicits diabetes in mice without affecting cold tolerance or fertility // Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005. Vol. 289, № 3. P. E403–411.
14. Gogiraju R. *et al.* Deletion of endothelial leptin receptors in mice promotes diet-induced obesity // Sci Rep. 2023. Vol. 13, № 1. P. 8276.
15. Morioka T. *et al.* Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice // J Clin Invest. 2007. Vol. 117, № 10. P. 2860–2868.
16. Guo K. *et al.* Disruption of peripheral leptin signaling in mice results in hyperleptinemia without associated metabolic abnormalities // Endocrinology. 2007. Vol. 148, № 8. P. 3987–3997.
17. Wu-Peng X.S. *et al.* Phenotype of the obese Koletsky (f) rat due to Tyr763Stop mutation in the extracellular domain of the leptin receptor (*Lepr*): evidence for deficient plasma-to-CSF transport of leptin in both the Zucker and Koletsky obese rat // Diabetes. 1997. Vol. 46, № 3. P. 513–518.
18. Bao D. *et al.* Preliminary Characterization of a Leptin Receptor Knockout Rat Created by CRISPR/Cas9 System // Sci Rep. 2015. Vol. 5. P. 15942.
19. Matsuhisa F. *et al.* Transgenic Rabbit Models: Now and the Future // Applied Sciences. 2020. Vol. 10, № 21.
20. Maslennikova A. *et al.* Engineering T-Cell Resistance to HIV-1 Infection via Knock-In of Peptides from the Heptad Repeat 2 Domain of gp41 // mBio. 2022. Vol. 13, № 1. P. e0358921.
21. Sakurai T. *et al.* A single blastocyst assay optimized for detecting CRISPR/Cas9 system-induced indel mutations in mice // BMC Biotechnol. 2014. Vol. 14. P. 69.
22. Green M.R., Sambrook J. Preparation of Genomic DNA from Mouse Tails and Other Small Samples // Cold Spring Harb Protoc. 2017. Vol. 2017, № 9. P. pdb.prot093518.
23. Абрашова Т.В. *et al.* // СПРАВОЧНИК. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. СПб: ЛЕМА, 2013. P. с.15.

GENERATION OF *LEPR* KNOCKOUT RABBITS WITH CRISPR/CAS9 SYSTEM

Y. Y. Silaeva¹, P. D. Safonova², D. V. Popov³, M. A. Filatov¹, Y. D. Okulova¹,
R. A. Shafei⁴, O. I. Skobel³, D. E. Vysotskii³, Y. D. Gubarev⁵, V. I. Glazko³,
T. T. Glazko³, Academician of the RAS P. G. Georgiev², G. Y. Kosovsky³, M. V. Shepelev^{1, #}

¹*Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine,
Institute of Gene Biology Russian academy of sciences, Moscow, Russian Federation*

²*Institute of Gene Biology Russian academy of sciences, Moscow, Russian Federation*

³*Afanas'ev Research Institute of Fur – Bearing Animal Breeding and Rabbit Breeding, Rodniki, Moscow region, Russia*

⁴*Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

⁵*Belgorod National Research University, Belgorod, Russian Federation*

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

In humans mutations in the *LEPR* gene, encoding leptin hormone receptor, are associated with the development of morbid obesity, lipid metabolism dysregulation, defects of fertility. In rodents spontaneous mutations in *LEPR* gene have been described. *LEPR* knock-out (KO) animals have been generated using classical KO technology or CRISPR/Cas9 system. In rodents lipid metabolism is significantly different from that in humans or rabbits, therefore rabbits are considered as the most relevant model of morbid obesity and lipid metabolism dysregulation in humans, but so far *LEPR* knock-out rabbits have not been reported. Here using CRISPR/Cas9 system we generated *LEPR* knock-out rabbit by introducing a deletion of the region around exon 10 of the *LEPR* gene. We showed that the body weight of the knock-out rabbit was significantly higher than an average body weight of the wild type rabbits. CRISPR/Cas9-mediated technology for the generation of the *LEPR* knock-out rabbits will allow for the development of the model of morbid obesity and endocrine defects in humans due to leptin receptor mutations.

Keywords: CRISPR/Cas9, *LEPR*, leptin, genetically modified rabbit

УДК 612.67. 612.017

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ ГОМЕОСТАЗА КРЫС ВИСТАР НА ХОЛОДОВОЙ СТРЕСС: ЗАКАЛИВАНИЕ, ИЛИ ДЕЗОРГАНИЗАЦИЯ?

© 2024 г. М. В. Кондашевская^{1, *}, К. А. Артемьева¹, В. В. Алексанкина¹, Е. Б. Манухина²,
член-корреспондент РАН Л. М. Михалева¹

Поступило 20.05.2024 г.

После доработки 15.06.2024 г.

Принято к публикации 17.07.2024 г.

Воздействие холода, особенно в сочетании с физическими нагрузками, является распространенным закалывающим мероприятием. Однако мало изучено влияние таких процедур на людей и животных в преклонном возрасте. В данном исследовании, проводимом с использованием показателя коэффициента стабильности гомеостаза, впервые представлена комплексная информация о реакции организма старых и молодых крыс Вистар на 20-минутное плавание в холодной воде. Изучено влияние на гормональную, гематологическую и морфофункциональную систему печени и тимуса. У старых интактных крыс обнаружены неблагоприятные возрастные изменения стабильности гомеостаза, которые затрудняют восстановление организма после холодового стресса и требуют задействования большего числа гомеостатических механизмов по сравнению с молодыми животными. Было обнаружено, что печень является наиболее уязвимым органом к холодовому стрессу. Сделан вывод о возможности изменения процедур холодового закалывания в пожилом возрасте с учетом возрастных ограничений.

Ключевые слова: молодые и старые крысы, холодовой стресс, закалывание, адаптация, биоиндикаторы, коэффициент стабильности гомеостаза

DOI: 10.31857/S2686738924050086

ВВЕДЕНИЕ

Старение — разрушительный биологический процесс, который развивается с возрастом, обуславливает ограничение адаптационных возможностей организма, что часто является причиной формирования возрастной патологии. Н. Selye рассматривал старение и смерть с позиции истощения «адаптационной энергии» — объема энергии, запрограммированной при рождении и расходуемой для адаптации к регулярно изменяющимся условиям среды, то есть к стресс-факторам. Ученый считал, что адаптационную энергию можно восстановить, если сохранился потенциал ресурсов [1]. В настоящее время активно

изучаются механизмы старения, а также лекарственные и нелекарственные методы восстановления резервных возможностей организма человека и животных. Например, доказано, что физические упражнения являются эффективным средством оздоровления и повышения жизнеспособности пожилых людей [2]. Поскольку установлено, что дозированное влияние факторов среды, таких как гипоксия, физические нагрузки, высокие и низкие температуры, способно повышать устойчивость и резервные возможности организма при неблагоприятных воздействиях, исследователи продолжают изучать срочные и долговременные механизмы адаптации и способы сочетанного применения нагрузок [3, 4]. На сегодняшний день достаточно много работ по изучению влияния холодовых воздействий, проводимых в основном на молодых людях и животных, но чрезвычайно мало известно о реакции организма старых индивидов и особей [4, 5].

Цель работы: используя комплексный показатель — коэффициент стабильности гомеостаза, сравнить реакцию организма старых и молодых крыс Вистар на плавание в холодной воде.

¹Научно-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

²ФГБНУ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

*e-mail: marivladiko@mail.ru

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в осенне-зимний период на 80 половозрелых самцах крыс Вистар в возрасте 3 мес (масса тела 200–220 г, $n = 40$) и 19 мес (масса тела 650–750 г, $n = 40$) (питомник Филиал «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» России). Животных содержали по 5 особей в клетке при естественном освещении и температуре 20–22°C. Доступ к воде и пище был свободным.

Для моделирования холодового воздействия в водной среде (ХВС) крыс погружали в емкость с холодной ($t = +4^\circ\text{C}$) водой, где они поодиночке свободно плавали в течение 20 мин, при температуре окружающего воздуха $+22^\circ\text{C}$.

Было проведено 2 серии экспериментов. Крыс серии 1 выводили из эксперимента путем декапитации под наркозом (диэтиловый эфир) через 1 час после ХВС: 1 группа – интактные молодые крысы ($n = 10$); 2 – молодые животные, подвергавшиеся ХВС ($n = 10$); 3 – старые интактные крысы ($n = 10$); 4 – старые особи, подвергавшиеся ХВС ($n = 10$). Крыс серии 2 выводили из эксперимента через 14 суток после ХВС, были сформированы группы, аналогичные серии 1 ($n = 40$).

Гистологическое исследование

Фрагменты тимуса, печени и сердца фиксировали в забуференном нейтральном формалине ($\text{pH} = 7.4$) в течение 48 ч, заливали в парафин, изготавливали гистологические срезы толщиной 5 мкм. Срезы тимуса окрашивали гематоксилином и эозином, на микрофотографиях определяли среднюю оптическую плотность (ОП) клеток функциональных зон с помощью программы “ImageJ” 1.48d (Wayne Rasband (США)). Срезы печени и сердца окрашивали гистохимическим методом на содержание гликогена, используя реакцию ШИК (PAS) без докраски гематоксилином [6]. Оценку плотности окраски (содержание гликогена) производили на микрофотографиях с помощью программы “ImageJ”. Количество полей зрения для каждой группы составляло не менее 10 при увеличении 400.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Концентрацию гормонов определяли в периферической крови, полученной при декапитации из шейных сосудов. Вытекающую из шеи кровь собирали в пробирки с активатором свертывания (Xinle, Китай), центрифугировали при 200 g в течение 20 мин, отбирали сыворотку, в которой методом ИФА определяли концентрацию кортизола (IBL, Германия), общего тестостерона (DVC, Канада) и мелатонина (Cusabio, Китай). Для регистрации

использовали микропланшетный ИФА-анализатор «ANTHOS 2010» (Австрия).

Для определения показателей красной крови использовали свежую кровь, которую исследовали с помощью автоматического гематологического анализатора Mindray bc 2800 vet (Китай) с программным обеспечением Rat. Определяли: уровень гемоглобина в крови – HGB, число эритроцитов – RBC, среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците – MCHC, среднее содержание гемоглобина в эритроците – MCH.

Оценка изменений полученных показателей

Суммарную динамику изменений изучаемых показателей оценивали по коэффициенту стабильности гомеостаза (КСГ), который представляет собой сумму значений всех гормональных, гематологических и морфофункциональных параметров, взятых в процентном отношении к соответствующим значениям показателей интактных молодых крыс и отнесенных к общему числу изучаемых параметров (всего 12) [7, 8].

Статистический метод

Сравнение экспериментальных групп производили при помощи ANOVA, критерия Краскела–Уоллеса для множественных сравнений, U-критерия Манна–Уитни для парных сравнений и критерия χ^2 Пирсона. Данные получали в виде $M \pm SEM$ (среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего), затем значения всех параметров выражали в процентном отношении к показателям интактных молодых животных, которые принимали за 100%. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Показатели гомеостаза старых и молодых крыс Вистар через 1 ч после ХВС

Холодовое воздействие не провоцировало изменения внешнего вида и массы тела крыс в какие-либо периоды эксперимента. Через 1 ч после ХВС у молодых и старых животных наблюдалось ожидаемое повышение уровня кортизола. Однако, у старых особей, подвергавшихся ХВС, уровень кортизола был ниже, чем у молодых в тех же условиях (рис. 1А). Уровень мелатонина у молодых животных при ХВС оказался достоверно значимо выше, чем у одновозрастных интактных, тогда как у старых крыс при ХВС содержание мелатонина не претерпевало изменений, оставаясь почти на 50% ниже уровня молодых интактных особей. Вызывали интерес изменения уровня анаболического гормона – тестостерона, который снижался после

ХВС у молодых крыс, но повышался у старых животных. В то же время, содержание тестостерона у интактных старых особей было значительно ниже, чем у аналогичной группы молодых (рис. 1А).

Значительную стабильность проявили показатели красной крови, которые не изменялись при ХВС у молодых крыс. В отличие от молодых интактных животных, старые интактные крысы характеризовались повышенным числом эритроцитов (RBC) в периферической крови, но пониженными значениями среднего содержания гемоглобина в эритроците (МСН). После ХВС у старых животных наблюдалось снижение RBC и средней концентрации гемоглобина в эритроците (МСН) при повышении МСН (рис. 1В).

Морфологические признаки снижения энергетического резерва организма были выявлены при измерении ОП гистохимической окраски на гликоген у всех групп, подвергавшихся ХВС (рис. 1С). У интактных старых особей по сравнению с интактными молодыми крысами зарегистрированы более низкие значения уровня гликогена в печени.

Кроме того, в отличие от молодых, после ХВС у старых животных снижалось содержание гликогена в миокарде (рис. 1С).

По сравнению с молодыми интактными крысами тимус старых крыс характеризовался существенным уменьшением клеточного состава всех функциональных зон. После ХВС у молодых и старых крыс наблюдалось утолщение субкапсулярной зоны. Вместе с тем, у старых животных увеличивалось заполнение клетками коркового вещества (1D).

Показатели гомеостаза старых и молодых крыс Вистар через 14 сут после ХВС

Судя по всем показателям, приведенным на рис. 2, кроме уровня ОП гликогена в печени, который оставался ниже нормы, организм молодых крыс возвратился к исходному состоянию через 14 сут после стресса (рис. 2). При этом у старых животных после ХВС наблюдалось снижение содержания мелатонина и показателя красной крови МСН

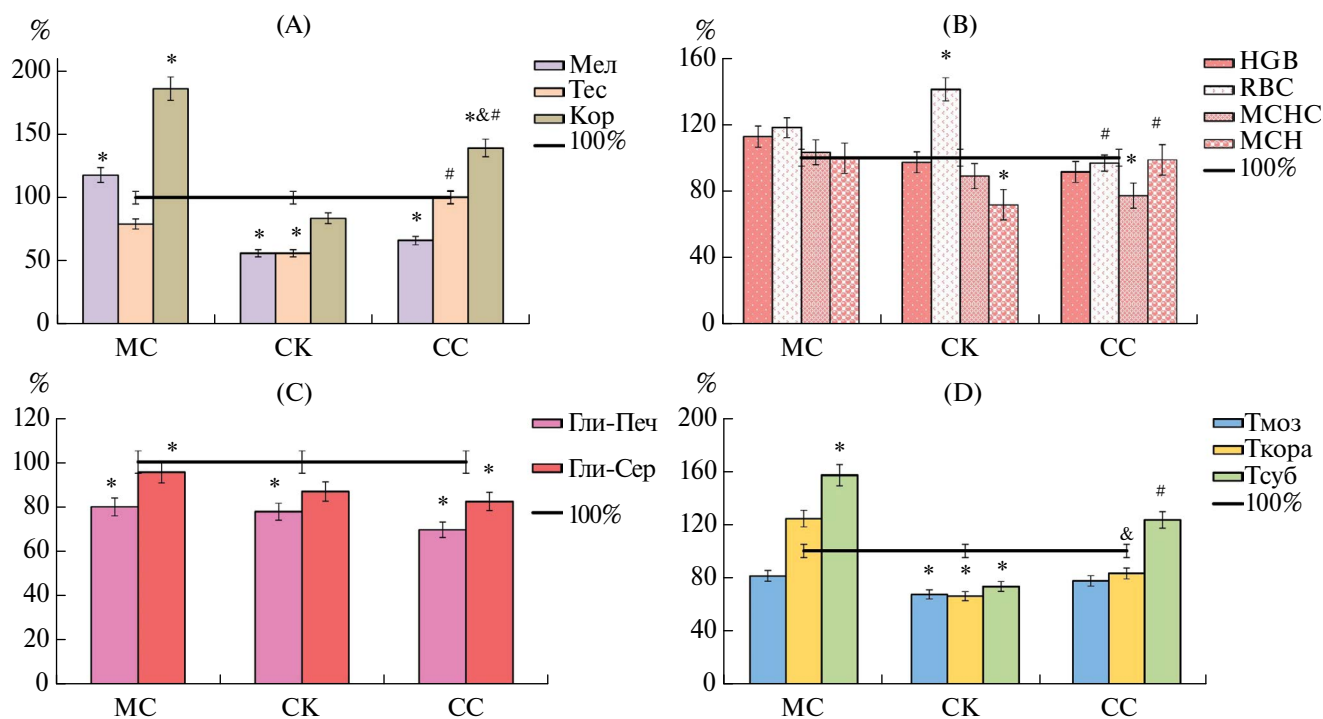


Рис. 1. Значения гормональных, гематологических и морфофункциональных параметров гомеостаза крыс через 1 ч после холодового воздействия водной среды (ХВС) в процентном отношении к показателям интактных молодых животных (показатели интактных животных приняты за 100%).

1А – гормональный фон: Мел – мелатонин, Тес – тестостерон, Кор – кортизол; 1В – показатели красной крови: HGB – уровень гемоглобина в крови, RBC – число эритроцитов, МСНС – средняя концентрация гемоглобина в эритроците, МСН – среднее содержание гемоглобина в эритроците; 1С – значения оптической плотности (ОП) окраски на гликоген в печени (Гли-Печ) и сердце (Гли-Сер); 1D – значения ОП клеток функциональных зон тимуса: Тмоз – мозговое вещество, Ткора – корковое вещество, Тсуб – субкапсулярная зона. MC – молодые крысы после ХВС, CK – старые интактные крысы, CC – старые животные после ХВС. * $p < 0.05$ по сравнению с интактными молодыми крысами (МК); & $p < 0.05$ сравнение MC и CC; # $p < 0.05$ сравнение CK и CC (по критерию χ^2 Пирсона).

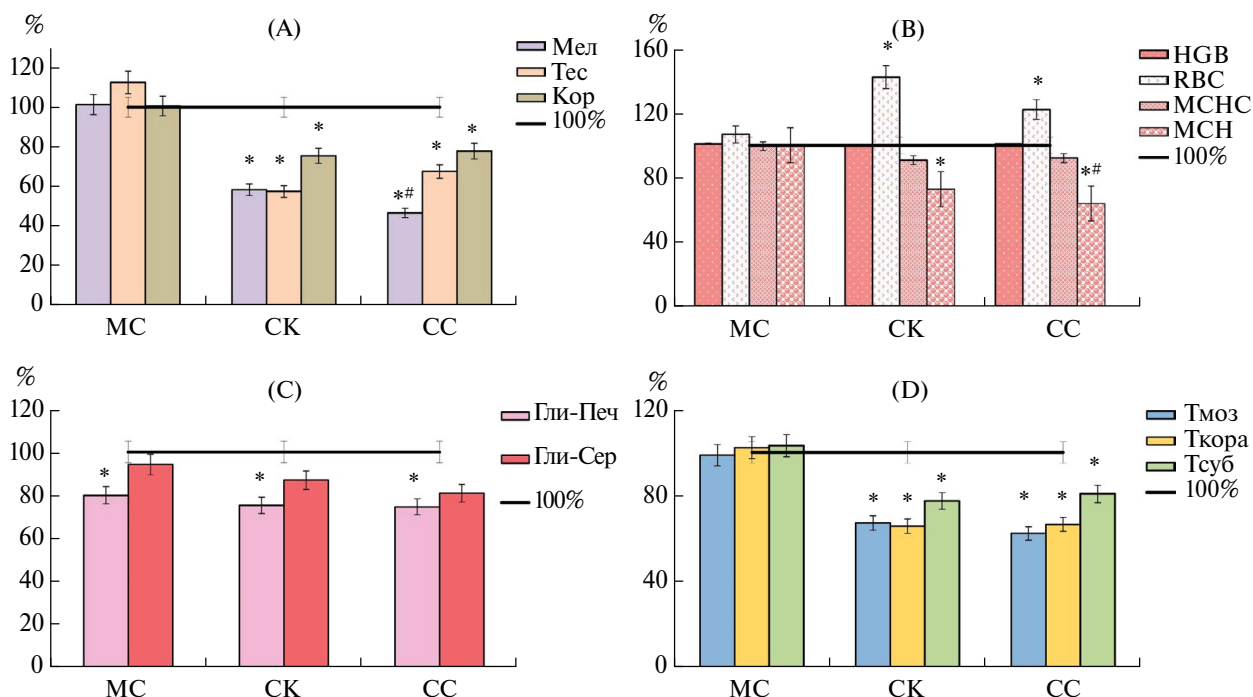


Рис. 2. Значения гормональных, гематологических и морфофункциональных параметров гомеостаза крыс через 14 суток после холодного воздействия водной среды в процентном отношении к показателям интактных молодых животных (показатели интактных животных приняты за 100%). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

в то время, как все остальные параметры гомеостаза, включая уровень гликогена печени, достигали своего исходного уровня (рис. 2).

Показатели возрастной и ситуационной вариабельности коэффициента стабильности гомеостаза крыс Вистар через 1 ч и 14 суток после ХВС

На рисунке 3 видно, что абсолютные показатели коэффициента КСГ у интактных старых крыс были гораздо ниже, чем у молодых интактных особей. Интересно отметить, что через 1 ч примененный нами однократный стресс в виде ХВС индуцировал повышение КСГ как у молодых, так и у старых животных. Тем не менее, через 14 сут после ХВС значения КСГ достигли своего исходного возрастного уровня (рис. 3).

В данной работе проведено исследование реакции гомеостаза молодых и старых крыс Вистар на однократный 20-минутный холодовой стресс в водной среде (ХВС, $t = +4^{\circ}\text{C}$) через 1 час и 14 суток. Изучали гормональные показатели важнейших катаболических и анаболических гормонов (кортизола, мелатонина, тестостерона), показатели красной крови, содержания гликогена в печени и сердце, а также клеточного состава функциональных зон главного органа иммунной системы — тимуса. Вычисляли вариабельность

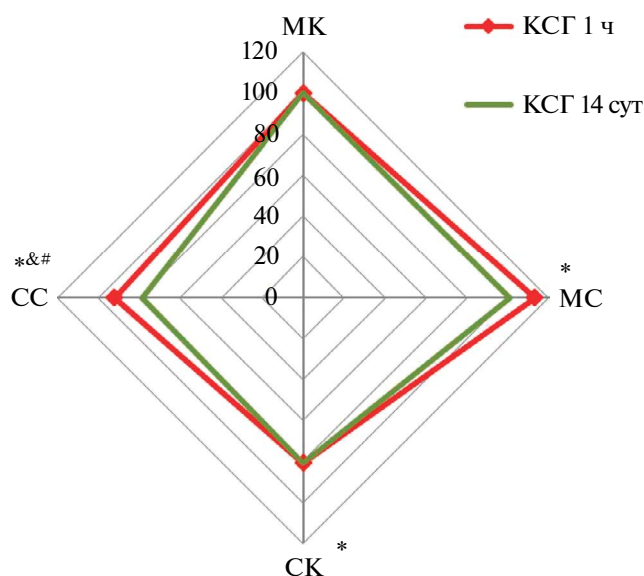


Рис. 3. Возрастная и ситуационная вариабельность коэффициента стабильности гомеостаза (КСГ) у молодых и старых крыс Вистар через 1 ч и 14 сут после холодного воздействия водной среды (ХВС). МК — молодые интактные крысы, MC — молодые особи после ХВС, CK — старые интактные крысы, CC — старые животные после ХВС. * $p < 0.05$ по сравнению с нормой МК; $^{\&}p < 0.05$ сравнение MC и CC; $^{\#}p < 0.05$ сравнение CK и CC (по критерию χ^2 Пирсона).

коэффициента стабильности гомеостаза (КСГ) в зависимости от возраста и промежутка времени после ХВС. Особо следует отметить, что впервые нами зарегистрировано повышение КСГ у молодых и старых крыс через 1 час после воздействия ХВС. Вероятно, использованная разновидность и длительность стресса способствовали мобилизации защитных сил организма животных, в результате чего адаптация пошла по пути эустресса, то есть полезного стресса. Следовательно, у всех животных оказалось достаточно защитных ресурсов для преодоления последствий воздействия ХВС, в связи с чем применяемые в нашем эксперименте условия охлаждения можно считать закаливающей адаптацией к стрессу.

У молодых крыс возможными причинами развития эустресса стало повышение уровня кортизола и мелатонина. О протекторных механизмах кортизола при стрессе достаточно много известно. Судя по общей реакции КСГ — его повышению, усиление секреции кортизола не вышло за рамки допустимого, и нарушения эффективности ответа на стресс не произошло. Вместе с тем, в научной литературе нередко появляются сведения о негативном влиянии кортикостерона, или кортизола на выработку важного анаболического гормона, тестостерона у молодых животных, что мы и обнаружили в нашем эксперименте. Тем не менее, снижение выработки тестостерона не привело к развитию дистресса [9, 10]. Повышение у молодых особей уровня мелатонина, вероятно, обеспечило защиту от развития оксидативного стресса, так как в настоящее время сформировалось мнение о направленном влиянии этого гормона на инактивацию активных форм кислорода (АФК), перепроизводство которых митохондриями обычно наблюдается при стрессе. Достаточно давно установлено, что избыток митохондриальных АФК отрицательно влияет на гомеостаз организма животных и человека [11]. Устойчивость показателей красной крови — наиболее важного звена гомеостаза, очевидно, сыграла протекторную роль в защите от дистресса молодых крыс. Также имело свое положительное значение то, что ОП клеточного состава тимуса и содержания гликогена в сердце практически не отличались от таковых у интактных животных. Снижение показателей ОП гликогена в печени при стрессе, вероятно, явилось отражением расхода энергетических запасов на интенсификацию многочисленных метаболических процессов в организме. Необходимо отметить, что значения ОП гликогена печени, в отличие от остальных параметров, не вернулись к норме даже через 14 суток после стресса.

При анализе показателей старых крыс нами установлено снижение КСГ с возрастом у интактных животных, что уже отмечалось в работе И.А. Виноградовой и соавт. [8]. По сравнению с молодыми интактными особями у старых животных

зарегистрировано снижение уровня всех исследуемых гормонов, содержания гликогена в печени, числа клеток во всех функциональных зонах тимуса. Не выявлено возрастных различий лишь по ОП гликогена в сердце. В то же время, число эритроцитов в периферической крови старых интактных крыс оказалось повышенным, а показатель МСН — сниженным. Аналогичные возрастные изменения зафиксированы в работе О.К. Мустафиной и соавт. [12].

Как известно, старение сопровождается нарушением регуляции адаптационных процессов [13]. Однако, в нашем эксперименте КСГ у старых крыс после ХВС оказался повышенным. Вероятно, такой эффект был достигнут тем, что в ответ на стресс наблюдалось повышение не только уровня кортизола, но и секреции тестостерона. В работах с применением экзогенного тестостерона часто сообщается, что в организме старых животных и людей наблюдается индукция адаптивной защитной реакции, в частности через изменение экспрессии генов [14, 15]. Анаболические свойства тестостерона способствуют усилению синтеза аминокислот, нуклеотидов, полисахаридов, белков, АТФ, необходимых для осуществления защитных адаптивных реакций. Особенно хорошо известно стимулирующее действие тестостерона на нервную мышечную систему, в том числе и на миокард [16]. Возможно, подъем уровня тестостерона через 1 час после стресса способствовал возвращению к исходным значениям уровня гликогена в миокарде и печени через 14 суток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данном исследовании установлены существенные неблагоприятные возрастные инволюционные изменения коэффициента стабильности гомеостаза у интактных старых крыс Вистар. Использование данного параметра позволило обнаружить, что в ответ на однократный 20-минутный холодовой стресс ($t = +4^{\circ}\text{C}$) в водной среде, через 1 час у старых и молодых животных сформировался позитивный адаптивный процесс — эустресс, свидетельствующий о закаливании организма. Организм молодых животных справился с повышенной нагрузкой, используя меньшее число гомеостатических механизмов. Напряжение организма старых крыс обусловило интенсификацию секреции тестостерона и наращивание клеточного состава тимуса. Как у молодых, так и у старых животных наиболее чувствительным и уязвимым к стрессу органом оказалась печень. Сделан вывод о возможности применения процедур холодового закаливания людей в пожилом возрасте с учетом возрастных ограничений. Однако, после холодовой процедуры не рекомендуется

употребление крепких напитков и острой пищи, негативно действующих на печень. Все процедуры закаливания рекомендуется осуществлять под систематическим контролем лечащего специалиста.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках Госзадания лаборатории патологии клетки НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского № 1023100400015-7-3.1.9, а также Госзадания лаборатории регуляторных механизмов стресса и адаптации ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии № FGFU-2022-0011.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все экспериментальные процедуры проводили согласно требованиям и международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, используемых для экспериментальных и научных целей. Исследование одобрено Комитетом по биоэтике Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» (протокол № 34 от 22 апреля 2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Selye H.* Experimental evidence supporting the conception of «adaptation energy» // *Am. J. Physiol.* 1938. V. 123. P. 758–765.
2. *Багнюк И.С.* Физкультура для людей среднего и пожилого возраста // *Вопросы экспертизы и качества медицинской помощи.* 2023. № 2. С. 6–8.
3. *Negaresh R., Ranjbar R., Habibi A. et al.* The effect of resistance training on quadriceps muscle volume and some growth factors in elderly and young men // *Adv Gerontol.* 2017. V. 30. № 6. P. 880–887.
4. *Ajjimaporn A., Chaunchaiyakul R., Pitsamai S. et al.* Effect of cold shower on recovery from high-intensity cycling in the heat // *J Strength Cond Res.* 2019. V. 33. № 8. P. 2233–2240.
5. *Сонькин В.Д., Якушкин А.В., Акимов Е.Б. и др.* Физиологический анализ перекрестной адаптации к холодовым воздействиям и физическим нагрузкам // *Физиология человека.* 2014. Т. 40. № 6. С. 98–113.
6. *Bezborodkina N.N., Okovityi S.V., Kudryavtsev B.N.* Postprandial Glycogen Content Is Increased in the Hepatocytes of Human and Rat Cirrhotic Liver // *Cells.* 2021. V. 10. P. 976.
7. *Хавинсон В.Х., Морозов В.Г.* Применение пептидов тимуса в качестве геропротекторных средств // *Пробл. старения и долголетия.* 1991. Т. 1. № 2. С. 123–128.
8. *Виноградова И.А., Букалев А.В., Забежинский М.А. и др.* Влияние светового режима и мелатонина на гомеостаз, продолжительность жизни и развитие спонтанных опухолей у самок крыс // *Успехи геронтол.* 2007. Т. 20. № 4. С. 40–47.
9. *Maeda N., Fujiki J., Hasegawa Y. et al.* Testicular induced corticosterone synthesis in male rats under fasting stress // *Steroids.* 2022. V. 177. P. 108947.
10. *Angelier F, Wingfield JC.* Importance of the glucocorticoid stress response in a changing world: theory, hypotheses and perspectives // *Gen Comp Endocrinol.* 2013. V. 190. P. 118–28.
11. *Zhang B., Pan C., Feng C. et al.* Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation // *Redox Rep.* 2022. V. 27. № 1. P. 45–52.
12. *Мустафина О.К., Трушина Э.Н., Шумакова А.А. и др.* Гематологические показатели у крыс Вистар разного возраста, содержащихся на полусинтетическом полноценном виварном рационе // *Вопр. Питания.* 2013. № 2. С. 10–16.
13. *Lissek Th.* Aging, adaptation and maladaptation // *Front Aging.* 2023. V. 4. P. 1256844.
14. *Moreau KL, Babcock MC, Hildreth KL.* Sex differences in vascular aging in response to testosterone // *Biol Sex Differ.* 2020. V. 11. № 1. P. 18.
15. *Calabrese V, Scapagnini G., Davinelli S. et al.* Sex hormonal regulation and hormesis in aging and longevity: role of vitagenes // *J Cell Commun Signal.* 2014. V. 8. № 4. P. 369–84.
16. *Crewther B.T., Cook C., Cardinale M. et al.* Two emerging concepts for elite athletes: the short-term effects of testosterone and cortisol on the neuromuscular system and the dose-response training role of these endogenous hormones // *Sports Med.* 2011. V. 41. № 2. P. 103–23.

AGE PECULIARITIES OF HOMEOSTASIS RESPONSE IN WISTAR RATS TO COLD STRESS: HARDENING OR DISORGANIZATION?

**M. V. Kondashevskaya^{a, #}, K. A. Artemyeva^a, V. V. Aleksankina^a, E.B. Manukhina^b,
and Corresponding Member of the RAS L. M. Mikhaleva^a**

*^aAvtsyn Research Institute of Human Morphology Federal State Budgetary Scientific Institution
“Petrovsky National Research Centre of Surgery”, Moscow, Russian Federation*

*^bFederal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of General Pathology and Pathophysiology,
Moscow, Russian Federation*

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

Cold exposure, especially in combination with physical activity, are common hardening procedures. However, the effects of such procedures in old age have been little studied. This study, conducted using the homeostasis stability coefficient indicator, provides for the first time comprehensive information on the body response of old and young Wistar rats to a 20-minute swim in cold water. The effects of hormonal, hematological and morphofunctional systems have been studied. Unfavorable age-related changes in the stability of homeostasis were discovered in old rats, which complicate its recovery after cold stress and require the involvement of a greater number of homeostatic mechanisms compared to young animals. The liver was found to be the most vulnerable organ to cold stress. It is concluded that it is possible to use cold hardening procedures in old age, considering age restrictions.

Keywords: young and old Wistar rats, swimming in cold water, homeostasis stability coefficient

УДК 599.323.45

ВНУТРИВИДОВАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ СЕРОЙ КРЫСЫ (*RATTUS NORVEGICUS*) В РОССИИ ПО ДАННЫМ D-LOOP МТДНК

© 2024 г. А. Н. Мальцев^{1, 4, *}, И. В. Картавцева², В. В. Стахеев³, В. Ю. Комаров⁴,
Ю. А. Баженов⁵, Л. А. Хляп¹, Е. В. Котенкова¹

Представлено академиком РАН В. В. Рожновым

Поступило 20.03.2024 г.

После доработки 30.04.2024 г.

Принято к публикации 10.05.2024 г.

Впервые для территории России проведено исследование внутривидовой структуры серой крысы (*Rattus norvegicus*) с использованием митохондриального маркера контрольного региона (D-loop) мтДНК. Проанализированы последовательности мтДНК из 8 регионов европейской и азиатской частей России. Выявлено три клады серых крыс, из них: в европейской части России – 1, в азиатской – 2. Синантропный подвид – *R. n. norvegicus* представлен европейской и азиатской линиями. В европейскую линию вошли гаплотипы из регионов центральной части и юга России, в азиатскую – из Восточной Сибири и Дальнего Востока. Выделен в отдельную генетическую линию ранее описанный экзотропный подвид – *R. n. caraco* с Дальнего Востока России.

Ключевые слова: серая крыса, внутривидовая структура, D-loop мтДНК, *Rattus norvegicus*, *R. n. norvegicus*, *R. n. caraco*

DOI: 10.31857/S2686738924050096

Серая крыса (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769), относящаяся к настоящим синантропным видам грызунов, расселилась вместе с человеком по всему миру, включая территорию России [1, 2]. Серые крысы повсеместно причиняют существенный вред здоровью человека, являясь переносчиками опасных инфекций, наносят урон инфраструктурам (повреждая коммуникации и др.) и входят в число самых опасных инвазивных видов России [3]. Ранее считалось, что

родина этого вида – равнины Северо-Восточного Китая [4]. Однако недавние палеонтологические находки предковых форм серой крысы, датированные 1.2–1.6 млн лет, обнаруженные в Юго-Западном Китае [5], свидетельствуют в пользу происхождения вида на юге Китая. Это подтверждается и рядом молекулярно-генетических исследований ядерной и мтДНК [6, 7]. На территорию России древние очаги обитания серой крысы – экзотропной формы *R. n. caraco* – сформировались на Дальнем Востоке и Приамурье, граничащими с Китаем. Синантропная форма серой крысы появилась в Западной Европе в XVI веке и оттуда проникла в европейскую часть России [8, 9]. Несмотря на обширный ареал, изменчивость серых крыс относительно невелика по сравнению с другими настоящими синантропными видами, принадлежащими к надвидовому комплексу *Mus musculus* s.l. По данным экологии и морфологии в настоящее время в области первичного ареала серой крысы (Китай) различают четыре подвида: (*R. norvegicus norvegicus*, *R. n. caraco*, *R. n. humiliatus*, *R. n. soccer*) [10–12]. В России обитают *R. n. norvegicus* и *R. n. caraco* [13, 14]. Внутривидовая структура

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

²Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

³Федеральный исследовательский центр ЮНЦ РАН, Ростов-на-Дону, Россия

⁴Институт Дезинфектологии ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, Москва, Россия

⁵Институт природных ресурсов, экологии и криологии СО РАН, Чита, Россия

*e-mail: mus-musculus@yandex.ru

серой крысы изучалась на территории Центральной Азии, Западной Европы, Северной Америки и Африки [6, 7, 9, 15, 16]. Однако, исследование внутривидовой структуры *R. norvegicus* на территории России с применением молекулярно-генетических методов не проводилось, изучены лишь единичные образцы, собранные в европейской и азиатской частях России [9, 16]. Среди специальных исследований морфологического полиморфизма можно отметить лишь книгу Ю.Л. Вигорова [14], который детально проанализировал изменчивость экстерьерных и краниологических признаков крыс Евразии с помощью имеющихся на тот момент методов. Согласно его данным, серые крысы из Восточной Сибири и Дальнего Востока по ряду диагностических признаков заметно отличаются от европейских. Без использования молекулярно-генетических методов исследования серой крысы на территории России невозможно представить полную картину филогеографической структуры этого вида в Палеарктике. В связи с этим цель нашего исследования состояла в изучении внутривидовой структуры *R. norvegicus* по данным изменчивости контрольного региона мтДНК (D-loop).

В качестве молекулярного митохондриального маркера использован контрольный регион мтДНК. Материалом для молекулярно-генетического анализа было 47 серых крыс, отловленных в 8 регионах России: Москва — 12; Московская область — 1 (п. Лесной, Пушкинский район); Тульская область — 2 (г. Плавск); Ростовская область — 8 (г. Ростов-на-Дону); Забайкальский край — 12 (г. Чита); Приморский край — 8 (г. Владивосток — 5, пос. Рубиновка — 2, г. Комсомольск-на-Амуре — 1); Хабаровский край — 2 (Советско-Гаванский район, п. Лососина), Еврейская автономная область — 2 (с. Ленинское). На Дальнем Востоке 4 (ЕАО с. Ленинское — 2, Приморский край, пос. Рубиновка — 2) из 12 особей, использованных в исследовании были по морфологическим признакам идентифицированы как представители подвида *R. n. caraco* [12]. Они были отловлены в природных станциях и отличались меньшими размерами и двухцветным опушенным хвостом.

Работа выполнена в ЦКП «Инструментальные методы в экологии» ИПЭЭ РАН. Для выделения ДНК использовали наборы DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) и набор для выделения ДНК из тканей животных «Tissue» (Raissol, Sesana). ПЦР проведена в термоциклере SimpliAmp™ (Applied Biosystems). Амплификация осуществлялась с помощью набора двух Мастер-микс HotStarTaq Plus (Qiagen). В 25 мкл реакционной смеси входил микс из смеси полимераз (HS-Taq и Pfu), смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов, ПЦР-буфер, Mg²⁺ и другие реагенты (ДНК-матрица — 1–2 нг, деионизированная вода (H₂O), прямой и обратный

праймеры — 0.1–800 нМ). Режим ПЦР включал следующие условия: 94°C в течение 3 мин, 25 циклов амплификации (94°C — 30 с, 58°C — 30 с и 72°C — 1 мин 30 с и финальную достройку цепей (72°C — 10 мин). ПЦР для тотальной ДНК серых крыс проведена с использованием праймеров контрольного региона (D-loop) мтДНК [6]. Длина анализируемых последовательностей после выравнивания составила 746 пн.

Выравнивание последовательностей производилось с помощью программы Bioedit v.7.0.5.3. [17]. Филогенетическая сеть Median Joining построена в программе Network [18]. Р-дистанция между филогенетическими группами посчитана в программе Mega X [19].

В результате филогенетического анализа выявлено 23 гаплотипа серых крыс. Гаплотипы на медианной сети представлены двумя подвидами — *R. n. norvegicus* и *R. n. caraco* (Рис. 1). При этом подвид *R. n. norvegicus* разделен на две клады: из европейской и азиатской частей России. Экзоантропный подвид *R. n. caraco* с Дальнего Востока выделяется в отдельную кладу.

Клада 1 включает преимущественно гаплотипы из европейской части России: г. Ростова-на-Дону, г. Москвы, Тульской области (г. Плавск) (рис. 1). Исключением были 2 гаплотипа из Хабаровского края (пос. Лососина). В кладу 2 из азиатской части России вошли гаплотипы из Восточной Сибири (г. Чита), Дальнего Востока (г. Владивосток) и г. Москвы. Генетическая дистанция между 1 и 2 кладами составила 0.006397 (р-дистанция). Третья кладка на медианной сети представлена гаплотипами особей, идентифицированных по экстерьерным признакам как представители подвида *R. n. caraco* (из Приморского края и Еврейской автономной области), в нее также вошли гаплотипы особей, идентифицированных по этим признакам как *R. n. norvegicus* (г. Комсомольск-на-Амуре и Московской области (пос. Лесной) (рис. 1). Значение р-дистанции между гаплотипами подвидов *R. n. caraco* и *R. n. norvegicus* составляет 0.008945 с европейской кладой и 0.005962 с азиатской соответственно.

Присутствие гаплотипов серых крыс из г. Москвы и Московской области в гаплогруппах азиатской части России и наоборот может свидетельствовать о постоянном расселении серых крыс вместе с человеком на дальние расстояния, что неоднократно фиксировали разные исследователи [2]. С Дальнего Востока России зверьки могли быть завезены в Центральную Россию и в обратном направлении по крупным транспортным магистралям (Трансиб, БАМ). На это указывает сходство гаплотипа особи из г. Москвы (18KP) и гаплотипов из г. Владивостока в азиатской кладке. Между представителями экзоантропных и синантропных подвидов серых крыс может

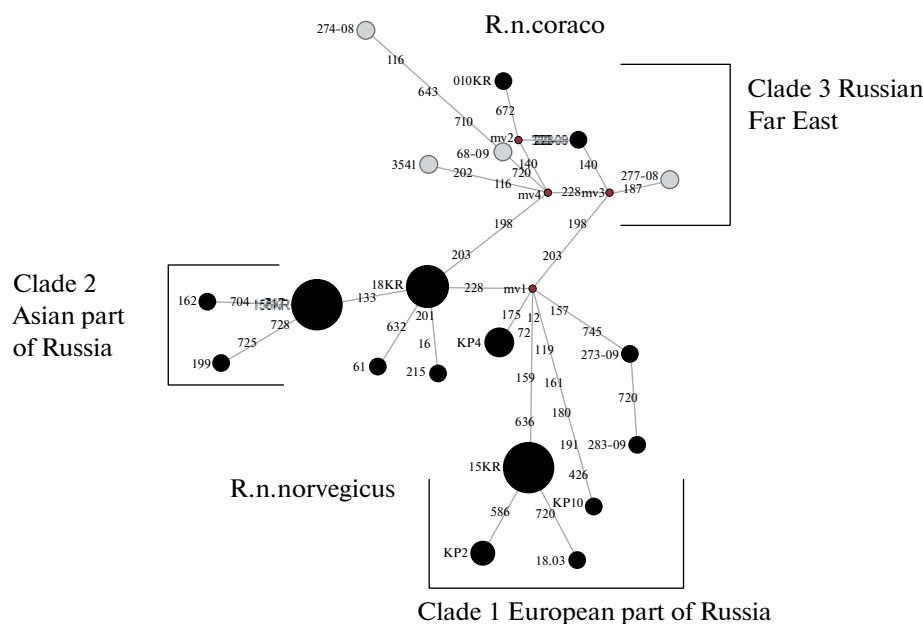


Рис. 1. Филогенетический анализ гаплотипов серых крыс.

происходить гибридизация. Так, ранее на севере Китая была отмечена гибридизация между другими близкими формами *R. norvegicus* [12]. Ю.Л. Вигоров, работавший с подвидом *R. n. caraco* в Восточной Сибири и на Дальнем Востоке, также не исключал скрещивание в природе представителей этого экзoантропоного подвида с синантропным подвидом *R. n. norvegicus* [14]. В нашем исследовании мы также обнаружили предполагаемых гибридов, которые вошли в состав третьей клады *R. n. caraco* (рис. 1, № 010KR, 328-09).

Согласно данным других исследований на основании анализа как ядерной, так и мтДНК [6, 7, 9] гаплотипы серых крыс также разделяются на две генетические линии — европейскую и азиатскую, каждая из которых может подразделяться на несколько кластеров. Происхождение серых крыс с территории России пока до конца неизвестно. Имеются лишь единичные данные, указывающие на общность происхождения серых крыс из Центральной России (г. Москва, г. Тверь) и крыс из Скандинавии [9].

В заключение отметим, что несмотря на относительно недавнее заселение территории России серыми крысами, их внутривидовая структура неоднородна и характеризуется разделением на два подвида: *R. n. norvegicus* и *R. n. caraco*. Синантропный подвид *R. n. norvegicus* заселяет большую часть территории России и представлен европейской и азиатской гаплогруппами. Экзoантропоный подвид *R. n. caraco* обитает преимущественно на Дальнем Востоке и гибридизует с номинативной синантропной формой. Приспособление отдельных

форм серой крысы к разным природным условиям и переход к синантропному образу жизни могли способствовать дифференциации до подвидового уровня.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00482.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Содержание животных после отлова и их умерщвление проведены в соответствии с правилами Европейской конвенцией о защите позвоночных. Одобрено Биоэтической комиссией ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН. Протокол № 39 от 27.07.2020 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kucheruk V.V. Synanthropic rodents and their significance in the transmission of infections //

- Theoretical questions of natural foci diseases. Prague, 1965. P.353–366.
2. Кучерук В.В., Кузиков И.В. Современный ареал серой крысы // Распространение и экология серой крысы и методы ограничения ее численности. М.: Наука.1985. С.17–52.
 3. Петросян В.Г., Хляп Л.А. Самые опасные инвазионные виды России (ТОП-100) / Ред. Дгебуадзе Ю.Ю., Петросян В.Г., Хляп Л.А. М.: Т-во научных изданий КМК, 2018. 688 с.
 4. Hedrich H.J. History, Strains and Models. In: Krinke GJ, Buton T, editors. The laboratory Rat (Handbook of Experimental Animals). London: Academic. Press, 2000. P. 1871–1895.
 5. Wu X., Wang Y. Fossil materials and migrations of *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* // Research of China's Frontier Archaeology. 2012. V.1. P. 1–9.
 6. Song Y., Lan Z., Kohn M.H. Mitochondrial DNA phylogeography of the Norway rat // PLOS ONE. 2014. V. 9. Issue 2.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088425>.
 7. Zeng L., Ming C., Li Y., Su L-Y., Su Y-H., et al. Out of Southern East Asia of the Brown Rat Revealed by Large-Scale Genome Sequencing // Molecular Biology Evolution. V. 35. P. 149–158.
 8. Кащенко Н.Ф. Крысы и их заместители в Западной Сибири и Туркестане // Ежегодник зоол. Музея АН. 1912 (1913). Т. 17. С. 370–390.
 9. Puckett E.E., Magnussen E., Khlyap L.A., Strand T.M., Lundkvist A., Munshi-South J. Genomic analyses reveal three independent introductions of the invasive brown rat (*Rattus norvegicus*) to the Faroe Islands // Heredity, 2020. V.124. P. 15–27.
 10. Wu D. On subspecific differentiation of brown rat (*Rattus norvegicus* Berkenhout) in China // Acta Theoriologica Sinica, 1982. V. 2. P. 107–112.
 11. Wang Y.A. Complete checklist of mammal species and subspecies in China: a taxonomic and geographic reference. Beijing: China Forestry Publishing House. 2003. 394 p.
 12. Zhao L., Zhang J-X., Zhang Y.-H. Genetic boundary and gene flow between two parapatric subspecies of brown rats // Current Zoology. 2020. V. 66. P. 677–688.
 13. Аргириопуло А.И. Фауна СССР. Млекопитающие. Семейство Muridae — мыши. М.; Л.: Изд-во АН ССР, 1940. Т. 3. вып.5. 170 с.
 14. Вигоров Ю.Л. Сравнительная экология и изменчивость крыс Евразии. Екатеринбург: Наука, Урал. отделение, 1992. 144 с.
 15. Lack J., Hamilton M., Braun J., Mares M., Van Den Bussche R. Comparative phylogeography of invasive *Rattus rattus* and *Rattus norvegicus* in the U.S. reveals distinct colonization histories and dispersal // Biological Invasions. 2013. V.15. P. 1067–1087.
 16. Puckett E.E., Park J., Combs M. et al. Global population divergence and admixture of the brown rat (*Rattus norvegicus*) // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2016. V. 283(1841).20161762. doi: 10.1098/rspb.2016.1762.
 17. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucleic Acids Symposium Series. 1999. V. 41. P. 95–98.
 18. Bandelt H-J., Forster P., Röhl A. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies // Molecular Biology Evolution. 1999. V. 16(1). P. 37–48.
 19. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. Mega X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Molecular Biology Evolution. 2018.V. 35. P. 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096

INTRASPECIFIC VARIABILITY OF THE NORWAY RATS (*RATTUS NORVEGICUS*) IN RUSSIA ACCORDING TO D-LOOP MTDNA DATA

A. N. Maltsev^{1, 4, #}, I. V. Kartavtseva², V. V. Stakheev³, V. Y. Komarov⁴,
Y. A. Bazhenov⁵, L. A. Khlyap¹, E. V. Kotenkova¹

¹Severtsov Institute of Problems of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

²Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far East Branch, Russian Academy of Sciences,
Vladivostok, Russian Federation

³Southern Research Center, Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, Russian Federation

⁴Erism Research Institute of Disinfectology,
Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russian Federation

⁵Institute of Natural Resources, Ecology and Cryology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
Chita, Russian Federation

[#]e-mail: mus-musculus@yandex.ru

Presented by Academician of the RAS V.V. Rozhnov

For the first time in Russia, a study of the intraspecific structure of the brown rat (*Rattus norvegicus*) was carried out using the mitochondrial marker of the control region (D-loop) of mtDNA. MtDNA sequences of brown rats from 8 regions of the European and Asian parts of Russia were analyzed. Three clades of rats have been identified: in the European part of Russia – 1, in the Asian part – 2. Synanthropic subspecies – *R. n. norvegicus* is represented by European and Asian lineages. The European lineage included haplotypes from the regions of central and southern Russia, and the Asian lineage included haplotypes from Eastern Siberia and the Far East. The previously described free living subspecies, *R. n. caraco* from the Russian Far East was represented as separate genetic lineage.

Keywords: brown rat, intraspecific structure, D-loop mtDNA, *Rattus norvegicus*, *R. n. norvegicus*, *R. n. caraco*

УДК 616.8-092

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ БИОМОЛЕКУЛ ДНК И БЕЛКА В ПАТОГЕНЕЗЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

© 2024 г. А. В. Трофимов¹, Т. И. Власова^{1, *}, В. А. Трофимов¹,
Д. И. Сидоров¹, М. А. Спирина¹

Представлено академиком РАН И.В. Решетовым

Поступило 25.05.2024 г.

После доработки 20.06.2024 г.

Принято к публикации 30.06.2024 г.

В исследовании оценивались конформационные изменения биомолекул ДНК и белка при ишемическом инсульте (ИИ) разной степени тяжести методом РАМАН-спектроскопии. У больных с ИИ изменяется конформационная структура гемопорфирина и, как следствие, увеличивается отношение $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$ (сродство гемоглобина к лигандам) и регистрируется увеличение I_{1375}/I_{1172} (изменение конформации пирролов). Также наблюдаются изменения в спектрах геномных ДНК при частотах, обусловленных валентными колебаниями первичных аминов (3400 см^{-1}), вторичных аминов и гидроксильных, вовлеченных в водородную связь (3100 см^{-1}), CH_2 -групп сахаро-фосфатов (2900 см^{-1}), колебаниями вибрационных связей между азотистыми основаниями и сахарами (1400 см^{-1}). Таким образом, при ИИ наблюдаются значительные изменения в спектрах геномных ДНК и гемоглобина, которые свидетельствуют о конформационных перестройках данных молекул. При тяжелом ИИ выраженность выявленных изменений спектров ДНК и гемоглобина была максимальной.

Ключевые слова: ишемический инсульт, окислительный стресс, геномная ДНК, гемоглобин, ИК-спектроскопия

DOI: 10.31857/S2686738924050108

ВВЕДЕНИЕ

Ишемический инсульт (ИИ) является одной из основных причин инвалидизации пациентов во всем мире [1]. Нарушение кровоснабжения головного мозга приводит к развитию острой гипоксии и гибели нейронов [2]. Важным патогенетическим механизмом ишемического повреждения тканей является развитие воспаления с активацией иммунной системы и генерацией медиаторов воспаления, определяющих феномен вторичной альтерации и расширения зоны повреждения тканей при инфаркте головного мозга [3, 4]. При ИИ нейровоспаление начинается в течение нескольких минут после начала ишемии и продолжается в течение нескольких дней [5]. Одними из наиболее агрессивных молекул при

гипоксическом повреждении клеток и воспалении являются свободные радикалы. Окислительный стресс также ответственен за большую часть ишемически-реперфузионного повреждения, запуская механизмы клеточной гибели в ткани головного мозга [6, 7].

Цитотоксические эффекты окислительного стресса опосредованы развивающимися мембранодеструктивными процессами, повреждениями ДНК и белковых молекул и лежат в основе органических и системных дисфункций [9, 10]. Особый интерес представляют кислородтранспортная функция эритроцитов в условиях острой ишемии головного мозга. Изменение конформации гемоглобина и снижение его кислородтранспортной функции при ИИ может рассматриваться как вероятный механизм прогрессирования повреждения ткани головного мозга.

Несмотря на известные механизмы повреждающего действия окислительного стресса, роль конформационных изменений биомолекул ДНК и белков в патогенезе ишемического инсульта и прогнозировании его течения остается не до

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева»

*e-mail: v.t.i@bk.ru

конца изученной. Внедрение новых инструментальных методов диагностики расширяет возможности изучения ультраструктурных изменений при различной патологии [11].

Таким образом, определение изменений структуры молекул ДНК и гемоглобина представляет научно-практическую значимость в аспекте расширения теоретических представлений о патогенезе ИИ и разработке новых способов прогнозирования течения патологии и развития осложнений.

Цель исследования — методами ИК-спектроскопии и РАМАН-спектроскопии изучить конформационные изменения биомолекул ДНК и белка при ИИ разной степени тяжести.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клиническое исследование проведено на базе ГБУЗ РМ “Мордовской республиканской центральной клинической больницы” (г. Саранск). Все пациенты с ишемическим инсультом при поступлении были обследованы согласно действующим стандартам оказания медицинской помощи больным с острыми нарушениями мозгового кровообращения. Протокол клинического исследования составлен в соответствии с действующими этическими стандартами и одобрен локальным этическим комитетом медицинского института ФГБОУ ВО “МГУ им. Н.П. Огарева”. Объектом исследования выступила периферическая венозная кровь здоровых людей и пациентов с ишемическим инсультом, полученная в первые сутки заболевания при наличии информированного согласия.

Критерии включения пациентов в исследование: верифицированный диагноз ОНМК ишемического генеза.

Критерии исключения: возраст пациента моложе 35 и старше 70 лет; добровольный отказ от участия в исследовании; недееспособные пациенты и лица с острой психической продуктивной симптоматикой (психоз, бред, галлюцинации); продолжительность ишемического инсульта более трех суток или время начала заболевания неизвестно; наличие онкологических заболеваний, эндокринной патологии, ревматических болезней, ВИЧ-инфекции; состояние беременности и лактации; применение при сопутствующих заболеваниях цитостатиков, иммунодепрессантов и кортикостероидов.

Степень нарушений функций центральной нервной системы оценивались по критериям шкалы NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale — NIH Stroke Scale) с сопоставлением размера очага острой ишемии головного мозга, который регистрировался с помощью мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ) [12].

Обследуемые были разделены на группы: I — контрольная, включены практически здоровые (соблюдение критериев исключения, отсутствие на момент исследования острых и хронических заболеваний в стадии декомпенсации, отсутствие факторов риска по ишемическому инсульту) пациенты ($n = 20$; средний возраст 46.7 ± 5.3 , 10 мужчин, 10 женщин); II — пациенты с легкой степенью нарушений функций центральной нервной системы по шкале NIHSS от 1 до 4 баллов ($n = 20$; средний возраст 59.1 ± 8.2 , 11 мужчин, 9 женщин); III — пациенты со среднетяжелой степенью нарушений функций центральной нервной системы, очаговый неврологический дефицит соответствует по шкале NIHSS 5 — 14 баллам ($n = 20$; средний возраст 55.2 ± 7.3 , 14 мужчин, 6 женщин); IV — пациенты с тяжелой степенью нарушений функции центральной нервной системы, неврологический дефицит составил по шкале NIHSS 15—20 баллов ($n = 20$; средний возраст 58.1 ± 9.4 , 12 мужчин, 8 женщин).

ДНК выделяли из моноклеаров периферической крови по стандартной методике Boodram L.L. Для анализа конформационных изменений гемоглобина использовали мазки периферической крови.

Фурье спектры препаратов ДНК регистрировали на спектрометре IRPrestige-21 SHIMADZU (Япония) в диапазоне $400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$ (изменение интенсивности поглощения характерных полос рассчитывали по отношению к поглощению при частоте 4000 см^{-1}). Спектры комбинационного рассеивания (КР) гемоглобина исследовали на спектрометре *in via Basis* (Renishaw, Великобритания) в диапазоне $1355\text{--}1588\text{ см}^{-1}$ с последующим расчетом отношений интенсивностей для определения особенностей конформации гемоглобина.

Данные статистически обрабатывали. Проверка соответствия выборки закону нормального распределения проводилась с помощью критерия Шапиро—Уилка. В последующем для сравнения групп использовали непараметрический критерий U Мана—Уитни. Корреляционный анализ также выполняли с использованием непараметрического критерия Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общий анализ крови при ИИ показал увеличение выраженности лейкоцитарной реакции и скорости оседания эритроцитов при увеличении тяжести состояния, также регистрировали снижение тромбоцитов относительно контроля при нарушении кровоснабжения головного мозга (рис. 1).

Показатели свертывающей способности крови (АЧТВ, ПТИ, МНО, фибриноген) у больных с различной тяжестью ишемического инсульта

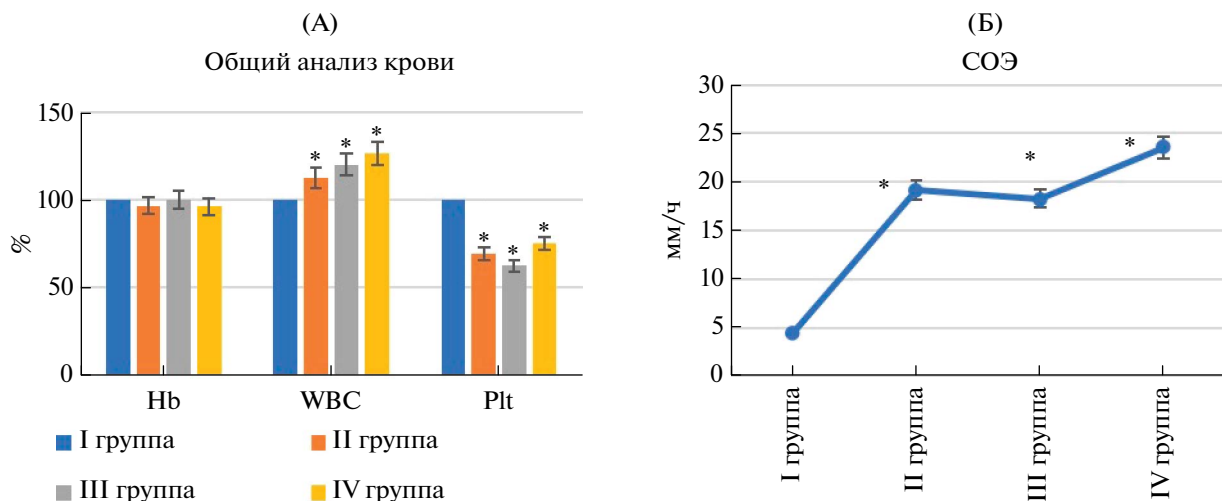


Рис. 1. Характеристика групп пациентов с ишемическим инсультом: общий анализ крови.

Примечание: Hb – гемоглобин, WBC – лейкоциты, Plt – тромбоциты, СОЭ – скорость оседания эритроцитов; * – достоверные отличия от данных контрольной (I) группы при $p < 0.05$.

отличались от показателей контроля, но при обсуждении результатов исследований следует учитывать прием больными препаратов с антикоагулянтным действием.

Оценка липидного профиля показала, что обследуемые с ИИ имеют повышенный уровень холестерина в венозной крови. У больных с легкой степенью тяжести ИИ содержание холестерина превышало показатели контроля в среднем на 51.8%. У пациентов со средней степенью тяжести ИИ содержание холестерина превышало показатели контроля на 62.4%, а при тяжелой форме заболевания содержание холестерина было выше показателей контроля на 97.3% ($p < 0.05$). У обследуемых с ИИ повышено содержание ЛПНП на 16.3% при легкой форме заболевания, на 63.7% при средней тяжести заболевания, при тяжелой форме в среднем на 85.3% относительно контроля. Содержание ЛПВП у больных с легким ИИ превышало показатели контроля на 53.0%, при средней степени тяжести также на 66.0% и у больных ИИ в тяжелой форме на 16.7%. Содержание ТГ в крови больных ишемическим инсультом было также повышено. Изменения в липидном спектре плазмы крови у больных ИИ указывает на дисбаланс в липидном обмене со смещением величины атерогенности с 2 в норме до 4.07 при тяжелой форме заболевания.

При различных заболеваниях, в том числе при ИИ, сопровождающихся развитием окислительного стресса, возникают реальные предпосылки для окислительных повреждений, имеющих далеко идущие функциональные нарушения, важнейших биополимеров – ДНК, выполняющих

информационную функцию, и молекул белков, обеспечивающих выполнение множества клеточных функций. При оценке содержания перекисей в плазме крови больных ИИ различной степени тяжести было выявлено повышение данного показателя при увеличении тяжести состояния (рис. 2).

Поскольку окислительный стресс является важнейшим патогенетическим звеном неврологических заболеваний, отличающимся глубиной и распространенностью в зависимости от природы заболевания, то безусловный интерес вызывает исследование повреждений и модификаций геномных ДНК и белков как фактора прогрессирования и утяжеления заболевания.

Для оценки кислородтранспортной функции эритроцитов применялся метод РАМАН-спектроскопии. Анализ спектров КР гемоглобина эритроцитов показал, что у больных с ишемическим инсультом изменяется конформационная

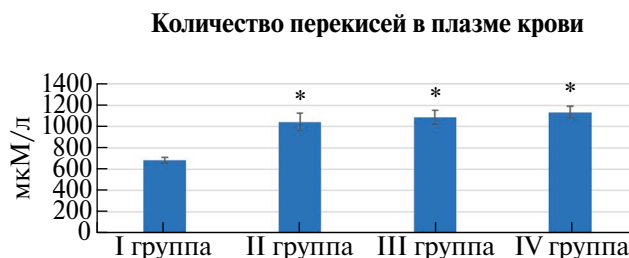


Рис. 2. Количество перекисей в плазме крови пациентов с ишемическим инсультом.

Примечание: * – достоверные отличия от данных контрольной (I) группы при $p < 0.05$.

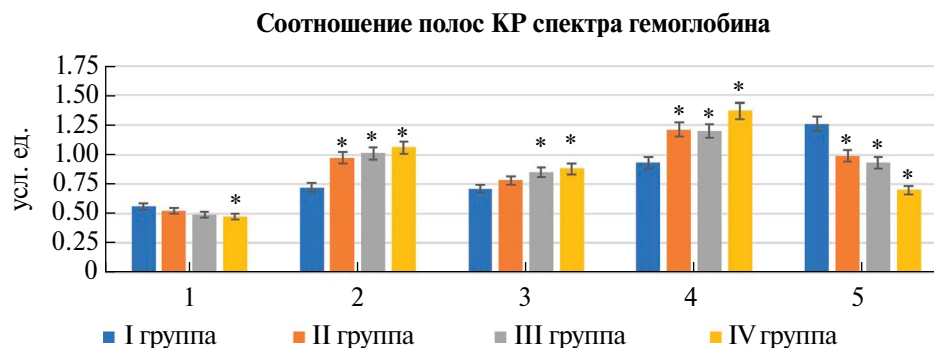


Рис. 3. Динамика изменение величин показателей, характеризующих кислородсвязывающую способность гемоглобина эритроцитов больных с ишемическим инсультом.

Примечание: 1 – $I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$ – содержание окси-Нб; 2 – I_{1355}/I_{1550} – способность Нб в пробе связывать лиганды; 3 – I_{1375}/I_{1580} – способность Нб выделять лиганды; 4 – $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$ – сродство Нб к лигандам; 5 – I_{1375}/I_{1172} – изменение конформации пирролов; * – достоверные отличия от данных контрольной (I) группы при $p < 0.05$.

структура гемопорфирина и, как следствие, угнетается кислородсвязывающая способность гемоглобина, максимально при тяжелой форме заболевания (рис. 3).

Вполне вероятно, что выявленный эффект формирования устойчивого оксигемоглобинового комплекса, является одной из причин нарушения кислородтранспортной функции эритроцитов при ИИ и может быть связан с образованием межбелковых сшивок, вызванных свободными радикалами, образующимися при окислительном стрессе, важнейшем патогенетическом компонентом ишемического инсульта [13].

Величина показателя I_{1375}/I_{1172} , характеризующая колебательную активность пиррольных колец, у больных с ишемическим инсультом уменьшается, что свидетельствует о конформационных изменениях пирролов, в результате чего эритроциты способны связывать кислород более эффективно, чем отдавать его [14].

Структурные изменения в ДНК изучали с помощью высокоинформативного метода ИК-спектроскопии – мощного инструмента диагностики структурных изменений в таких сложных молекулах как белки и нуклеиновые кислоты, а именно образование и разрыв водородных и других связей, изменения конформации и конфигурации. По изменению таких параметров как полоса и интенсивность поглощения, при разных частотах, их соотношения, можно судить не только о структурных изменениях, связанных с различными патологическими процессами, но и диагностировать уровень тяжести различных заболеваний [15].

Известно, что в стабилизации вторичной структуры ДНК важнейшую роль играют водородные связи между комплементарными парами азотистых оснований и гидрофобные взаимодействия между ними, направленные вдоль оси двойной спирали,

так называемые стэкинг-взаимодействия, усиливающие водородные связи между основаниями и способствуя уплотнению спирали. Ароматические кольца азотистых оснований в ДНК расположены перпендикулярно оси спирали молекулы биополимера, что обуславливает параллельность их поверхностей и перекрыванию р-орбиталей. Стабильность и характер такого рода взаимодействий зависят от связей между азотистыми основаниями и дезоксирибозой.

Описанные выше особенности структурной организации ДНК приводят к тому, что молекулы воды связываются в основном с полярными фосфатными группами, расположенными на поверхности сахарофосфатного остова молекулы ДНК.

Ослабление энергии стэкинг-взаимодействий приводит к проникновению молекул воды внутрь двойной спирали и нарушению водородных связей,

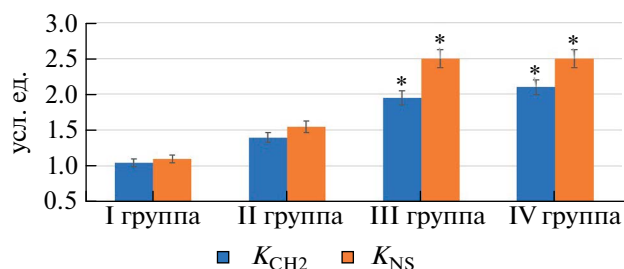


Рис. 4. Изменения величины показателей K_{CH_2} ($2500\text{ см}^{-1}/4000\text{ см}^{-1}$), характеризующего интенсивность поглощения $-CH_2$ групп сахарофосфатов, и K_{NS} ($1400\text{ см}^{-1}/4000\text{ см}^{-1}$), обусловленных колебаниями вибрационных связей между азотистыми основаниями и сахарами в зависимости от степени выраженности нарушений функций ЦНС при ишемическом инсульте. Примечание: * – достоверные отличия от данных контрольной (I) группы при $p < 0.05$.

дестабилизации двойной спирали и расхождению цепей ДНК. При чем процесс плавления цепей ДНК обратим и после окончания воздействия цепи ДНК, благодаря спариванию оснований, вновь образуют двойную спираль в участке их расхождения. Спектроскопия препаратов ДНК, полученных из крови больных с ишемическим инсультом различной степени тяжести, позволила выявить изменения в структуре сахарофосфатного остова молекулы, связанные со снижением стабильности связей дезоксирибоза-азотистое основание.

Полученные данные свидетельствуют о смещении взаимной ориентации фосфатных групп ДНК вследствие локального плавления и раскручивания двойной спирали, взаимообусловленных ослаблением водородных связей между азотистыми основаниями и стэкинг-взаимодействий, образованием изгибов и конформационной структуры ДНК в целом.

Дестабилизация двойной спирали облегчает расхождение цепей ДНК. Наиболее выражено описанные выше молекулярные перестройки, приводящие к изменению структуры ДНК, проявляются у больных с тяжелыми формами ИИ (рис. 4).

Полученные с помощью ИК-спектроскопии препаратов ДНК из крови больных ИИ данные об особенностях конформационной структуры свидетельствуют о возможных изменениях активности генетических процессов, включая экспрессивную активность генов, что нуждается в дальнейшем изучении.

Корреляционный анализ показал, что выраженность молекулярных изменений (ДНК и гемоглобин) была сопряжена с тяжестью состояния и выраженностью неврологического дефицита по шкале NIHSS ($r = 0.537-0.901$, $p < 0.05$).

Таким образом, у больных ИИ наблюдаются значительные изменения в ИК-спектрах геномных ДНК и гемоглобина, которые свидетельствует о конформационных перестройках данных молекул, как молекулярной основы изменения функциональной активности клеток при ИИ. Характер и интенсивность этих изменений зависят от тяжести заболевания, что определяет возможность использования их как биомаркеров ишемического инсульта.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней, а также были одобрены Локальным этическим комитетом Мордовского государственного университета (г. Саранск), протокол № 114 от 28 февраля 2023 года. Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Campbell B.C.V., Khatri P. Stroke. *Lancet*. 2020, vol. 396, no. 10244, pp.129–142. .
2. Semin D.A., Orlova V.M., Snegireva T.G. Quality of life and mental health of patients after a traumatic brain injury. *Head and Neck. Russian Journal*. 2022, vol. 10, no. S2S2, pp. 120–122.
3. Zhu H., Hu S., Li Y.Ю et al. Interleukins and Ischemic Stroke. *Front Immunol*. 2022 no. 13, pp. 828447.
4. Кастыро И.В., Костяева М.Г., Королев А.Г., и др. Влияние моделирования септопластики и хирургического повреждения верхней челюсти на изменения норадренергической системы гиппокампальной формации. *Folia Otorhinolaryngologiae et Pathologiae Respiratoriae*. 2023, Т. 29, № 2, С. 24–35.
5. Alsbrook D.L., Di Napoli M., Bhatia K., et al. Neuroinflammation in Acute Ischemic and Hemorrhagic Stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2023, vol. 23, no. 8, pp. 407–431.
6. Orellana-Urzúa S., Rojas I., Libano L., et al. Pathophysiology of Ischemic Stroke: Role of Oxidative Stress. *Curr Pharm Des*. 2020, vol. 26, no. 34, pp. 4246–4260.
7. Кастыро И.В., Хамидулин Г.В., Дьяченко Ю.Е., и др. Исследование экспрессии белка p53 и образования темных нейронов в гиппокампе у крыс при моделировании септопластики. *Российская ринология*. 2023, Т. 31, №1, С. 27–36.
8. Матвеев Д.В., Гаврилова С.А., Кузнецов М.Р., и др. Применение липосомально-антиоксидантного комплекса в профилактике и лечении синдрома реперфузии. Экспериментальное исследование. *Head and Neck / Голова и шея. Российское издание. Журнал Общероссийской общественной организации “Федерация специалистов по лечению заболеваний головы и шеи”*. 2022, vol. 10, no. 4, pp. 16–23.
9. Mnatsakanyan A., Korolev A., Inozemtsev A., et al. Modeling septoplasty and sensory deprivation in rat olfactory analyzer and its impact on the responses of the autonomic nervous system, *Archiv EuroMedica*. 2023, vol. 13, no. 1.

10. Ibragimova Zh.M., Kerimov Z.M., Shukurova P.A., et al. The study of the rate of oxygen uptake and lipid peroxidation reactions in the brain tissues and the lens of the eye of rats under the influence of electromagnetic radiation of non-thermal intensity in the pre-natal period (rattus wistar). *Head and Neck. Russian Journal*. 2022, T. 10, № S2S1, C. 28–31.
11. Саакян С.В., Складнев Д.А., Алексеева А.П., и др. Роль инструментальных методов диагностики в оценке метаболического статуса опухолей придаточного аппарата глаза. *Head and Neck / Голова и шея. Российское издание. Журнал Общероссийской общественной организации “Федерация специалистов по лечению заболеваний головы и шеи”*. 2024, T. 12, № 1, C. 128–135.
12. Aoki J, Kimura K, Koga M, Kario K, et al. NIHSS-time score easily predicts outcomes in rt-PA patients: the SAMURAI rt-PA registry. *J Neurol Sci*. 2013, vol. 327, no. 1–2, pp.6–11.
13. Трофимов А.В., Карасев А.А., Власова Т.И. Изменение кислородтранспортной способности гемоглобина больных с ишемическим инсультом. Регинарное кровообращение и микроциркуляция. 2023, T. 22, №4, C. 50–55.
14. Юшков Б.Г., Зуев М.Г., Бриллиант С.А., и др. Изучение конформации гема и глобина фракционированных эритроцитов крыс с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния света. *Биофизика*. 2023. T. 68, № 1, C. 33–40.
15. Трофимов В.А., Трофимов А.В., Кадималиев Д.А. Способ диагностики степени тяжести ишемического инсульта. *Патент на изобретение RU 2767929 C1*, 22.03.2022.

CONFORMATIONAL CHANGES IN DNA AND PROTEIN BIOMOLECULES IN THE PATHOGENESIS OF ISCHEMIC STROKE

A. V. Trofimov¹, T. I. Vlasova^{1, #}, V. A. Trofimov¹, D. I. Sidorov¹, M. A. Spirina¹

Presented by Academician of the RAS I.V. Reshetov

¹*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «National Research Mordovia State University», Saransk, Russia*

[#]*e-mail: v.t.i@bk.ru*

Abstract. The study assessed conformational changes in DNA and protein biomolecules during ischemic stroke (IS) of varying severity using RAMAN spectroscopy. In patients with IS, the conformational structure of hemoporphyrin changes and, as a consequence, the ratio (I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580}) (the affinity of hemoglobin for ligands) increases and an increase in I_{1375}/I_{1172} (change in the conformation of pyrroles) is recorded. Changes in the spectra of genomic DNA are also observed at frequencies caused by stretching vibrations of primary amines (3400 cm^{-1}), secondary amines and hydroxyls involved in hydrogen bonding (3100 cm^{-1}), CH₂ groups of sugar phosphates (2900 cm^{-1}), vibrations of vibrational bonds between nitrogenous bases and sugars (1400 cm^{-1}). During IS, significant changes are observed in the spectra of genomic DNA and hemoglobin, which indicate conformational rearrangements of these molecules. In severe IS, the severity of the detected changes in the spectra of DNA and hemoglobin was maximum.

Keywords: ischemic stroke, oxidative stress, genomic DNA, hemoglobin, IR spectroscopy. stress, genomic DNA, hemoglobin, IR spectroscopy

УДК 551.88:568.28/.29:598.284

ДРЕВНЕЙШАЯ ЛАСТОЧКА (AVES: PASSERIFORMES: HIRUNDINIDAE) ИЗ ВЕРХОВ НИЖНЕГО МИОЦЕНА ЮГА ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ

© 2024 г. Н. В. Волкова

Представлено академиком РАН А.В. Лопатиным

Поступило 18.06.2024 г.

После доработки 25.06.2024 г.

Принято к публикации 30.06.2024 г.

Описан новый род и вид ископаемых ласточек *Miochelidon eschata* gen. et sp. nov. из раннего миоцена Прибайкалья. Это единственный миоценовый представитель Hirundinidae и древнейшая находка группы в палеонтологической летописи. Строение коракоида *Miochelidon* сочетает генерализованные и специализированные черты, что позволяет предполагать базальное положение этого рода в семействе. Локтевая кость имеет продвинутую морфологию, как у изученных современных ласточек. Находка указывает на широкое распространение базальных ласточек в раннем миоцене.

Ключевые слова: ископаемые птицы, Passeriformes, Hirundinidae, ранний миоцен, Юго-Восточная Сибирь, Байкал

DOI: 10.31857/S2686738924050117

Ласточки (Passeriformes, Hirundinidae) — специализированные к питанию насекомыми в воздухе воробьеобразные птицы, адаптированные к длительному, быстрому и маневренному полету. Ласточки предпочитают открытые местообитания и зачастую встречаются у воды [1]. Палеонтологическая летопись семейства скудна, поэтому происхождение и эволюция Hirundinidae остаются слабо изученными. Древнейшие находки приурочены к плиоценовым отложениям Восточной Европы, Центральной Азии (Монголии) и Северной Америки, откуда известны птицы из рода *Hirundo* [2–4]. Описаний более древних находок Hirundinidae нет.

В 2012–2021 гг. несколько десятков костей воробьеобразных птиц (Passeriformes) было собрано на местонахождении Тагай, расположенном на о. Ольхон оз. Байкал. Накопление костных остатков позвоночных в данном местонахождении происходило в конце раннего миоцена в условиях берега неглубокого озера рядом с лесом [5, 6]. Из Тагайского местонахождения известна представительная авифауна, уникальная для раннего

миоцена Азии [7–12]. Остатки Passeriformes из Тагай представляют древнейшие находки воробьеобразных на территории континентальной Азии, наряду с отпечатком черепа врановой птицы (Corvidae) из близких по возрасту отложений Линьцью (Linqi, Shandong) в Восточном Китае [13]. Среди собранных на местонахождении Тагай материалов имеются два фрагмента костей ласточек, отнесенных ниже к новому роду и виду Hirundinidae. Материал хранится в Палеонтологическом институте им. А.А. Борисяка РАН (ПИН, Москва).

Неполный правый коракоид (экз. ПИН, № 2614/485) отнесен к воробьеобразным (Passeriformes) на основании грацильности, хорошо выраженного и выступающего медиально processus acrocoracoideus, узкой facies articularis humeralis, а также плоской и слегка выступающей над поверхностью стержня кости facies articularis scapularis. Сильно вытянутый в медиальном направлении processus acrocoracoideus (рис. 1) характерен для ласточек и стрижей (Aerodidae), что указывает на приспособление к стремительному высокоманевренному полету. Поскольку среди Passeriformes нет других семейств с подобной морфологией, данный коракоид отнесен к Hirundinidae.

¹Палеонтологический институт им. А.А. Борисяка
Российской академии наук, Москва, Россия
e-mail: nvolkova@paleo.ru

Отряд Passeriformes Linnaeus, 1758
Семейство Hirundinidae Rafinesque, 1815
Род *Miochelidon* Volkova, gen. nov.

Название рода от миоцена и др. греч. χελιδών, ласточка.

Типовой вид — *Miochelidon eschata* Volkova, sp. nov.

Диагноз. Стержень коракоида в краниальной части тонкий и прямой (рис. 1). Узкий processus acrocoracoideus сильно вытянут медиально. Facies articularis scapularis крупная, четко отделяется от facies articularis humeralis и располагается в дорсальной плоскости, тогда как поверхность facies articularis humeralis ориентирована латерально. Processus procoracoideus относительно крупный с прямоугольной вершиной.

Видовой состав. Типовой вид.

Сравнение и замечания. Особенности сочленовных поверхностей коракоида, перечисленные в диагнозе, отличают *Miochelidon* от изученных современных ласточек. Для сравнения были использованы скелеты птиц из родов *Riparia*, *Tachycineta*, *Progne*, *Ptyonoprogne*, *Hirundo*, *Delichon*, *Cecropis*, *Petrochelidon*. При этом все изученные птицы крупнее и имеют более мощный коракоид. У современных ласточек facies articularis scapularis не крупная и часто плохо отделена визуально от facies articularis humeralis; также обе сочленовные поверхности располагаются в одной латерально ориентированной плоскости или под небольшим углом друг к другу. В отличие от относительно крупного processus procoracoideus *Miochelidon*, у современных Hirundininae processus procoracoideus небольшой, имеет форму короткого невысокого гребня, выступающего над медиальной поверхностью стержня коракоида, и не образует четко очерченный угол.

Строение коракоида *Miochelidon* демонстрирует промежуточное состояние между специализированными к реюшему полету современными ласточками и другими представителями клады Sylviida sensu Oliveros et al., 2019 [14], в которую входит семейство Hirundinidae. Относительно крупный processus procoracoideus *Miochelidon* близок по размеру и форме к таковым у некоторых представителей других семейств из клады Sylviida, например, Alaudidae и Paridae. Крупный processus procoracoideus характерен для базальных воробьеобразных, а также для большинства кричащих воробьиных (Tyranni) [15]. По-видимому, сохранение относительно крупного processus procoracoideus у некоторых певчих воробьиных (Passeri), в том числе и у *Miochelidon*, некоторых Alaudidae, Paridae и др. — плезиоморфный признак. Также *Miochelidon* близок к Paridae по форме и ориентации facies articularis scapularis, что, вероятно, можно трактовать как неспециализированное состояние плечевого сустава у этой древней ласточки. Сильно вытянутый медиально processus acrocoracoideus, характерный для Hirundinidae, — продвинутый признак, отражающий высокую степень специализации к реюшему полету.

Miochelidon eschata Volkova, sp. nov.

Название вида от др. греч. εσχάτος, дальний, находящийся на краю света.

Голотип — ПИН, № 2614/485, краниальная часть правого коракоида; оз. Байкал, о. Ольхон, 10 км западнее пос. Хужир, местонахождение Тагай; верхи нижнего миоцена, тагайская свита.

Описание (рис. 1, 2). Строение коракоида соответствует диагнозу рода. К *Miochelidon eschata* также предварительно отнесен проксимальный

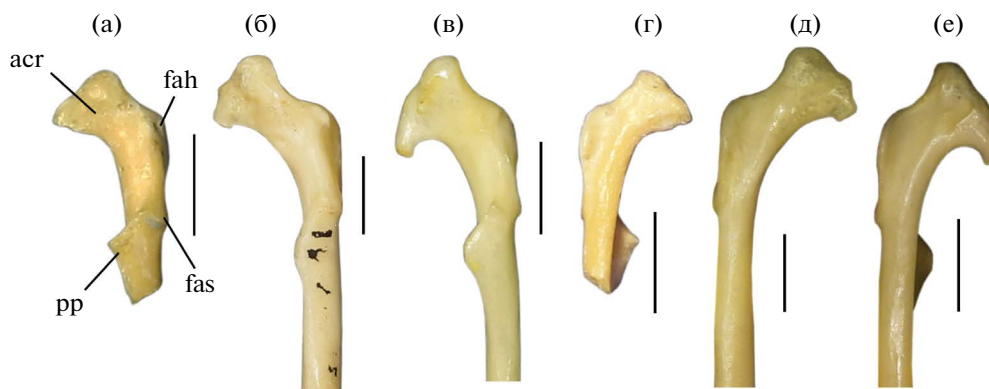


Рис. 1. Краниальные части правых коракоидов воробьеобразных птиц: а, г — *Miochelidon eschata* Volkova gen. et sp. nov., голотип ПИН, № 2614/485; оз. Байкал, о. Ольхон, местонахождение Тагай; верхи нижнего миоцена, тагайская свита; б, д — *Hirundo rustica* Linnaeus, 1758, остеологическая коллекция каб. палеорнитологии ПИН (ОКП) № 167-35-2, современный; в, е — *Parus major* Linnaeus, 1758, ОКП № 200-33-1, современный; а—в — дорсальная сторона, г—д — вентральная сторона. Обозначения: acr — processus acrocoracoideus, fah — facies articularis humeralis, fas — facies articularis scapularis, pp — processus procoracoideus. Масштабная линейка — 2 мм.

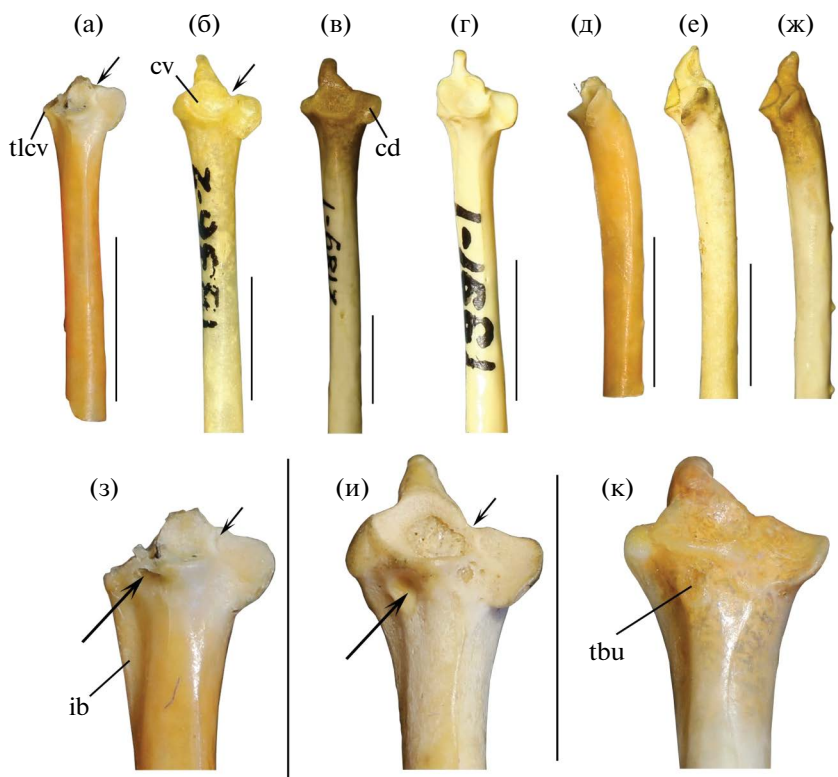


Рис. 2. Проксимальные части локтевых костей воробьеобразных птиц: а, д, з — *Miochelidon eschata* Volkova gen. et sp. nov., экз. ПИН, № 2614/486; оз. Байкал, о. Ольхон, местонахождение Тагай; верхи нижнего миоцена, тагайская свита; б, е, и — *Hirundo rustica* Linnaeus, 1758, остеологическая коллекция каб. палеорнитологии ПИН (ОКП) № 167-35-3, современный; в, к, ж — *Tyrannus tyrannus* (Linnaeus, 1758), ОКП № 153-68-1, современный; г — *Parus major* Linnaeus, 1758, ОКП № 200-33-1, современный; а–г, з–к — краниальная сторона; д–ж — дорсальная сторона. Обозначения: cd — cotyla dorsalis; cv — cotyla ventralis; ib — impressio brachialis; tbu — tuberculum bicipitale ulnae; tlcв — tuberculum lig. collateralis ventralis. Короткие стрелки указывают на впадину между cotyla dorsalis и cotyla ventralis, длинные стрелки — на ямку, в которой крепится сухожилие двуглавой мышцы плеча. Масштабная линейка — 5 мм.

фрагмент левой локтевой кости (экз. ПИН, № 2614/486), по относительному размеру соответствующий голотипу. Этот экземпляр сильно разрушен, однако по сохранившейся части понятно, что у него имелся крупный, видимый с краниальной стороны tuberculum lig. collateralis ventralis. Уцелевшая дорсальная половина cotyla ventralis позволяет реконструировать мышелок небольшого диаметра (меньше ширины стержня кости в проксимальной части). Cotyla dorsalis прямоугольной формы, а papillae gemigalis слабо выражены (рис. 2). Перечисленные признаки соответствуют характеристике локтевых костей Hirundinidae.

Размеры в мм. Экз. ПИН, № 2614/485: длина краниальной части коракоида от вершины processus acrocoracoideus до дистального края facies articularis scapularis — 3.6. Экз. ПИН, № 2614/486: диаметр стержня локтевой кости — 2.3.

Сравнение и замечания. Крупный tuberculum lig. collateralis ventralis на проксимальном конце локтевой кости характерен для

базальных клад Passeriformes — новозеландских крапивников (Acanthisitti) и кричащих воробьиных (Tyranni). У певчих воробьиных (Passeri) tuberculum lig. collateralis ventralis не выражен и представлен отпечатком связки на вентрокаудальной поверхности кости; исключение составляют Hirundinidae, некоторые Alaudidae и Bombycillidae. Мелкий в диаметре и глубокий cotyla ventralis позволяет отличить ласточек от других певчих воробьиных (Passeri). Диаметр cotyla ventralis на локтевой кости современных ласточек и экз. ПИН, № 2614/486 составляет примерно половину от ширины стержня в его проксимальной части, у дистального края processus cotylaris dorsalis. Диаметр cotyla ventralis других певчих воробьиных, включая Alaudidae и Bombycillidae, примерно равен аналогичной ширине стержня или превышает ее.

Ископаемая локтевая кость, как у всех ласточек, отличается от таковых у Acanthisitti и Tyranni прямоугольным и вытянутым проксимодистально cotyla dorsalis, у последних он короче, ближе к квадратной форме. В проксимальной части локтевой

кости между *cotyla dorsalis* и *cotyla ventralis* у ласточек расположена отчетливая впадина, которая отделена от обеих суставных ямок гребнями, формирующими их стенки. У *Acanthisitti* и части изученных *Tyranni* (например, *Tyrannus*) отчетливая впадина отсутствует. У некоторых *Tyranni* (например, *Furnarius*) *depressio humerotricipitalis* выражена, но она прободает проксимальную стенку *cotyla ventralis*. Кроме того, у экз. ПИН, № 2614/486, как у продвинутых певчих воробьиных (*Corvidae* и *Passerides*), под гребнем *cotyla ventralis* у проксимодорсального края *impressio brachialis* расположена глубокая ямка — место крепления сухожилия *m. biceps brachii*. У *Acanthisitti* и изученных *Tyranni*, кроме *Serilophus*, *Conopophaga* и *Syndactyla*, место крепления *m. biceps brachii* представлено слабо выраженным бугорком.

Для экз. ПИН, № 2614/486 отмечены признаки, состояние которых варьирует у современных ласточек. Дистальный край *processus cotylaris dorsalis* у ископаемой формы перпендикулярен стержню кости. У *Hirundinidae* дистальный край *processus cotylaris dorsalis* может быть перпендикулярным стержню (*Ptyonoprogne*, *Hirundo*), а может изгибаться, так что дистальная часть *processus cotylaris dorsalis* нависает над стержнем кости (*Riparia*, *Progne*, *Delichon*). *Impressio brachialis* у экз. ПИН, № 2614/486, глубокий, четко очерченный, как у *Petrochelidon* и *Delichon*. У многих *Hirundinidae* (например, *Ptyonoprogne*, *Hirundo*, *Riparia*, *Progne*) *impressio brachialis* часто мелкий, слабо выраженный. Наличие общих признаков в строении локтевой кости *Miochelidon* и современных представителей *Hirundinidae* может свидетельствовать о высокой степени специализации крыла уже у древних ласточек.

Материал. Голотип и экз. ПИН, № 2614/486, проксимальная часть левой локтевой кости из типового местонахождения.

Прослеживаемые на коракоиде и локтевой кости черты специализации к активному высокоманевренному режущему полету, характерному для насекомоядных птиц, кормящихся в открытом воздушном пространстве, позволяют уверенно отнести ископаемые материалы из Тагая к ласточкам (*Hirundinidae*). При этом филогенетическое положение *Miochelidon* в семействе *Hirundinidae* остается неясным. Современные ласточки делятся на два подсемейства. *Hirundininae* — крупнейшее подсемейство ласточек, в состав которого входят все современные роды за исключением *Pseudochelidon* [16]. Плезиоморфные черты строения коракоида указывают на базальное положение *Miochelidon* по отношению к современным представителям *Hirundininae*. В то же время строение локтевой кости *Miochelidon* отражает высокую степень специализации крыла, соответствующую таковой

у *Hirundininae*. Подсемейство *Pseudochelidoninae* состоит из одного рода с двумя видами речных ласточек [1]. Род *Pseudochelidon* характеризует специфическая общая морфология, сочетающая генерализованные черты воробьеобразных птиц со специализированными признаками ласточек [17, 18]. Они имеют относительно крупные лапы и в целом выглядят отлично от других ласточек. Особенности строения посткраниального скелета речных ласточек не известны. Отнесение тагайской ласточки к современному роду *Pseudochelidon* на основании сочетания плезиоморфных и продвинутых признаков не может считаться обоснованным. Кроме того, такое таксономическое решение может послужить ошибочной точкой калибровки в исследованиях эволюции *Hirundinidae* и близких групп. Вместе с тем, присутствие современного рода певчих воробьеобразных птиц в раннем миоцене Евразии крайне маловероятно, поскольку фауны этого возраста представлены почти исключительно ископаемыми родами. Для этого времени с территории Евразии известны лишь единичные виды современных родов птиц из филогенетически древних отрядов, например, гусеобразных (*Anseriformes*) и совообразных (*Strigiformes*) [19]. Воробьеобразные (*Passeriformes*) — эволюционно молодой отряд [19]. Время появления ласточек (*Hirundinidae*) по молекулярно-генетическим данным оценивается поздним олигоценом — ранним миоценом [14, 16, 20], а дивергенции *Pseudochelidoninae* и *Hirundininae* — средним миоценом [16]. Присутствие примитивной ласточки в раннем миоцене Юго-Восточной Сибири, вероятно, отражает широкое распространение древних ласточек в Азии на раннем этапе эволюции группы. Современное распространение базальных представителей *Hirundinidae* (*Pseudochelidon*, *Psilidoprocne*, *Cheramoeca* и *Pseudhirundo*) в тропических и субтропических регионах Африки, Юго-Восточной Азии и Австралии, по-видимому, является отчасти реликтовым.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит участников экспедиций 2014–2021 годов на местонахождение Тагай за кропотливый сбор материалов, а также акад. А.В. Лопатина и Н.В. Зеленкова (ПИН) за обсуждение данной работы и важные замечания к ней.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда, № 24-24-00470, <https://rscf.ru/project/24-24-00470/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проводилось на ископаемых и музейных материалах.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор данной работы заявляет, что у него нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Winkler D.W., Billerman S.M., Lovette I.J. Swallows (Hirundinidae), version 1.0 // Birds of the World. Ithaca, NY: Cornell Lab of Ornithology, 2020. <https://doi.org/10.2173/bow.hirund2.01>
2. Feduccia A. A new swallow from the Fox Canyon local fauna (Upper Pliocene) of Kansas // Condor. 1967. V. 69. P. 526–527.
3. Mlíkovský J. Cenozoic birds of the world. Part 1: Europe. Praha: Ninox Press, 2002. 406 p.
4. Zelenkov N.V., Kurochkin E.N. The first representative Pliocene assemblages of passerine birds in Asia (Northern Mongolia and Russian Transbaikalia) // Geobios. 2012. V. 45. P. 323–334. <http://dx.doi.org/10.1016/j.geobios.2011.10.001>
5. Daxner-Höck G., Mörs T., Kazansky A.Y., et al. A synthesis of fauna, palaeoenvironments and stratigraphy of the Miocene Tagay locality (Olkhon Island, Lake Baikal, Eastern Siberia) // Palaeobiodiversity and Palaeoenvironments. 2022. V. 102. P. 969–983. <https://doi.org/10.1007/s12549-022-00558-8>
6. Sinitsa M., Tesakov A. Squirrels (Rodentia, Sciuridae) of the Early Miocene Tagay fauna in Eastern Siberia // Biological Communications. 2023. V. 68. № 4. P. 273–290. <https://doi.org/10.21638/spbu03.2023.407>
7. Zelenkov N.V. Evolution of bird communities in the Neogene of Central Asia, with a review of the Neogene fossil record of Asian birds // Paleontological Journal. 2016. V. 50. № 12. P. 1421–1433. <https://doi.org/10.1134/S0031030116120200>
8. Зеленков Н.В. Примитивная поганка в нижнем миоцене Байкала (Восточная Сибирь) // Палеонтологический журнал. 2015. № 5. С. 69–77.
9. Zelenkov N.V. The first fossil parrot (Aves, Psittaciformes) from Siberia and its implications for the historical biogeography of Psittaciformes // Biology Letters. 2016. V. 12. 20160717. <http://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0717>
10. Волкова Н.В., Зеленков Н.В. Коттедлазующая воробынная птица (Passeriformes, Certhioidea) из верхов нижнего миоцена Восточной Сибири // Палеонтологический журнал. 2018. № 1. С. 53–60.
11. Zelenkov N.V., Stidham T.A., Martynovich N.V., et al. The middle Miocene duck *Chenoanas* (Aves, Anatidae): new species, phylogeny and geographical range // Papers in Palaeontology. 2018. V. 4. № 3. P. 309–326. <https://doi.org/10.1002/spp2.1107>
12. Volkova N.V. The first fossil barbet (Aves, Ramphastidae) from Siberia // Journal of Ornithology. 2020. V. 161. P. 325–332. <https://doi.org/10.1007/s10336-019-01719-x>
13. Ye X.-K., Sun B. Fossil rail and crow from Linqu, Shandong // Zoological Research. 1989. V. 10. № 3. P. 177–184.
14. Oliveros C.H., Field D.J., Ksepka D.T., et al. Earth history and the passerine superradiation // PNAS. 2019. V. 116. № 16. P. 7916–7925. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813206116>
15. Mayr G., Manegold A. New specimens of the earliest European passeriform bird // Acta Palaeontologica Polonica. 2006. V. 51. № 2. P. 315–323.
16. Schield D.R., Brown C.E., Shaky S.B., et al. Phylogeny and historical biogeography of the swallow family (Hirundinidae) inferred from comparisons of thousands of UCE loci // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2024. V. 197. 108111. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2024.108111>
17. Lowe P.R. Some anatomical notes on the genus *Pseudochelidon* Hartlaub with reference to its taxonomic position // Ibis. 1938. V. 80. № 3. P. 429–437.
18. Gaunt A.S. Myology of the leg in swallows // The Auk. 1969. V. 86. P. 41–53.
19. Mayr G. Avian evolution: the fossil record of birds and its paleobiological significance. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, Inc., 2017. 293 p.
20. Fjeldså J., Christidis L., Ericson P.G.P. (Eds). The largest avian radiation. The evolution of perching birds, or the order Passeriformes. Barcelona: Lynx Ed., 2020. 445 p.

THE OLDEST SWALLOW (AVES: PASSERIFORMES: HIRUNDINIDAE) FROM THE UPPER LOWER MIOCENE OF THE SOUTH OF EASTERN SIBERIA

N. V. Volkova

Presented by Academician of the RAS AV Lopatin

Borissiak Paleontological institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

A new genus and species of fossil swallows, *Miochelidon eschata* gen. et sp. nov., are described from the Lower Miocene of the Baikal region. This is the only Miocene representative of the Hirundinidae and the oldest fossil record of the group. The coracoid of *Miochelidon* combines generalized and specialized features, suggesting a basal position in the family for the genus. The ulna has a more advanced morphology, like in modern swallow. The find indicates a widespread distribution of basal swallows in the Early Miocene.

Keywords: fossil birds, extinct species, Passeriformes, Hirundinidae, Early Miocene, Southeastern Siberia, Baikal

УДК 569.742.7:551.793(477.75)

ГЕПАРД *ACINONYX PARDINENSIS* (FELIDAE, CARNIVORA) ИЗ РАННЕГО ПЛЕЙСТОЦЕНА КРЫМА (ПЕЩЕРА ТАВРИДА)

© 2024 г. Д. О. Гимранов^{1, *}, Х. Мадурелл-Малапейра², Ц. Цзянцзуо³,
А. В. Лавров⁴, академик РАН А. В. Лопатин⁴

Поступило 28.05.2024 г.

После доработки 25.06.2024 г.

Принято к публикации 30.06.2024 г.

Из раннеплейстоценового местонахождения в пещере Таврида (Крым, поздний виллафранк, около 1.8–1.5 млн л.н.) описан фрагмент нижнечелюстной кости *Acinonyx pardinensis* (Croizet et Jobert, 1828). Это первая находка рода *Acinonyx* в плейстоцене Крыма. Наряду с другими кошачьими, такими как *Homotherium*, *Megantereon*, *Panthera*, *Lynx* и *Puma*, гепарды были типичными представителями поздне-виллафранкских фаун Евразии. В местонахождении Таврида *Acinonyx pardinensis* обнаружен совместно с *Homotherium crenatidens*, *Megantereon adroveri* и *Lynx issiodorensis*.

Ключевые слова: *Acinonyx pardinensis*, кошачьи, поздний виллафранк, пещера Таврида, Крым

DOI: 10.31857/S2686738924050125

Появление рода *Acinonyx* Brookes, 1828 регистрируется в ископаемой летописи на уровне примерно 4 млн л.н. в Африке [1, 2]. С этой датировкой согласуются молекулярно-генетические данные, по которым линия гепардов и пум, включающая современных *Acinonyx jubatus* (Schreber, 1775), *Puma concolor* (Linnaeus, 1771) и *P. yagouaroundi* (Geoffroy, 1803), появилась в начале позднего миоцена, а в раннем плиоцене (в пределах 5–4 млн л.н.) произошло разделение *Acinonyx* и *Puma* [3, 4]. В Африке известны находки двух видов рода *Acinonyx*: *A. pardinensis* (Croizet et Jobert, 1828) и *A. jubatus*. В раннем плейстоцене *A. pardinensis* был широко распространен также в Евразии [5]. Ископаемые находки *A. jubatus* происходят только из Африки и датируются возрастом от 3.0 до 1.8 млн л.н. (хотя некоторые имеют спорный видовой статус) [2, 6].

¹Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

²Факультет наук о Земле, Флорентийский университет, Флоренция, Италия

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

⁴Палеонтологический институт им. А.А. Борисяка Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: djulfa250@rambler.ru

Acinonyx pardinensis, как и современный *A. jubatus*, по-видимому, мог развивать большую скорость бега, что связано с уникальной локомоторной адаптацией рода *Acinonyx*. При этом по размерам и массе тела (60–120 кг) *A. pardinensis* существенно превосходил *A. jubatus* и мог охотиться на добычу весом до 100 кг [2]. Некоторые авторы считают, что все плейстоценовые находки *Acinonyx* в Евразии принадлежат *A. pardinensis* [2, 5, 7, 8]. Однако новейшие исследования [9] показывают, что *A. pardinensis* населял Евразию на протяжении конца плиоцена и большей части раннего плейстоцена (2.8–1.3 млн л.н.), тогда как в конце раннего и начале среднего плейстоцена (1.3–0.6 млн л.н.) на этом континенте обитал *A. pleistocaenicus* (Zdansky, 1925), самый крупный представитель рода. В коротком промежутке среднего плейстоцена (около 0.5 млн л.н.) в Евразии также отмечен сравнительно мелкий *A. intermedius* Thenius, 1954 [9].

Помимо *Acinonyx*, в позднем виллафранке в Европе обитали и другие кошки весом более 10 кг, которые принадлежали к родам *Homotherium*, *Megantereon*, *Panthera*, *Lynx* и *Puma* [9, 10]. Эти различные по своим адаптациям животные делили трофические ниши крупных хищников, и гепарды, судя по всему, успешно конкурировали с остальными кошачьими.

Богатая поздневиллафранкская фауна позвоночных из пещеры Таврида в центральном Крыму датирована ранним плейстоценом (MQ1,

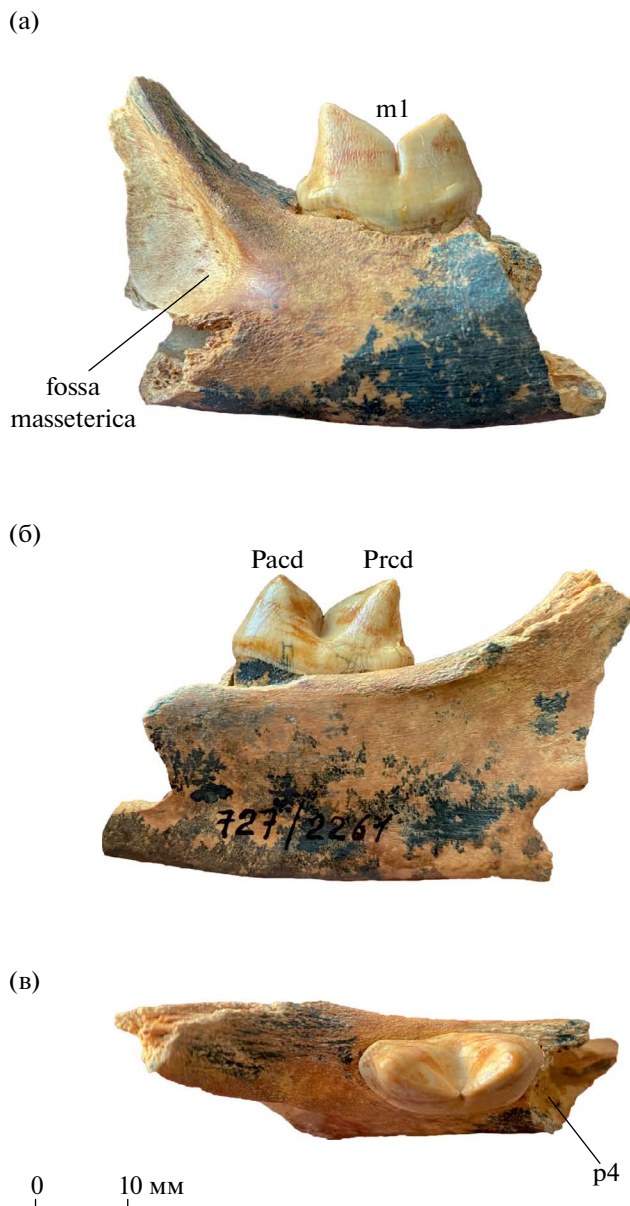


Рис. 1. *Acinonyx pardinensis* (Croizet et Jobert, 1828), экз. ИЭРЖ, № 727/2261, фрагмент правой нижнечелюстной кости с m1: а — с буккальной стороны, б — с лингвальной стороны, в — с окклюзиональной стороны; Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен. Обозначения: m1 — нижний хищнический зуб m1; p4 — альвеола заднего корня последнего нижнего предкоренного зуба p4; Pacd — параконид m1; Prcd — протоконид m1.

около 1.8–1.5 млн л.н.) [11]. Кошачьи представлены в пещере Таврида *Homotherium crenatidens* (Fabrini, 1890), *Megantereon adroveri* Pons-Moyà, 1987, *Lynx issiodorensis* (Croizet et Jobert, 1828) [12] и описываемой ниже находкой *A. pardinensis*. Ранее ископаемых остатков *Acinonyx* в Крыму не отмечалось, а всего в России были известны лишь две

находки *A. pardinensis* из раннеплейстоценовых (хапровских) местонахождений Северного Приазовья [13].

Описываемый материал из пещеры Таврида представлен фрагментом правой нижнечелюстной кости (экз. ИЭРЖ, № 727/2261, сборы 2022 г.). Образец хранится в музее Института экологии растений и животных Уральского отделения РАН (ИЭРЖ), Екатеринбург. Для сравнения были изучены коллекции *A. pardinensis* из виллафранкских местонахождений Этуэр, Сен-Валье (Франция), Унтермасфельд (Германия) и Вильярройя (Испания), хранящиеся в коллекциях Каталонского института палеонтологии Микеля Крусифона в Сабаделе, Испания (IPS), Музея естествознания и антропологии в Лионе, Франция (StV), и Научно-исследовательской станции четвертичной палеонтологии в Веймаре, Германия (IQW). Кроме того, были изучены материалы по *Puma pardoides* (Owen, 1846) из виллафранкских местонахождений Ла-Пуэбла-де-Вальверде, пещера Виктория (Испания), Тассо (Италия), Странска Скала (Чехия), Сен-Валье и Унтермасфельд, хранящиеся в тех же коллекциях, а также в Музее палеонтологии Флорентийского университета, Флоренция, Италия (IGF).

Измерения проводились штангенциркулем с точностью до 0.01 мм по ранее предложенной схеме [9]. Анализ главных компонент и построение графика выполнены в программе Past 4.0 (Sytle Studio).

Фрагмент правой нижнечелюстной кости (экз. ИЭРЖ, № 727/2261) содержит нестертый m1 и часть задней альвеолы p4; передняя часть горизонтальной ветви утрачена, восходящая ветвь обломана на уровне нижнечелюстного отверстия (foramen mandibulae). Нижнечелюстное отверстие высокое, с округлым передним краем. Край области прикрепления медиальной порции височной мышцы (musculus temporalis pars medialis) на медиальной стороне основания венечного отростка хорошо выраженный, рельефный. Его передняя часть доходит до уровня заднего выступа m1, вентрально рельеф области крепления височной мышцы не распространяется. Горизонтальная ветвь нижнечелюстной кости в сохранившейся области достаточно высокая и массивная. Передняя часть массетерной впадины (fossa masseterica) имеет плавное поднятие и сглаженный рельеф. Передний край массетерной впадины находится немного дистальнее заднего края m1.

Нижний хищнический зуб m1 массивный, передняя стенка параконида наклонена назад, хищническая вырезка хорошо выражена. Протоконид выше и массивнее параконида. На буккальной и лингвальной сторонах зуба эмаль струйчатая. Короткий, но отчетливый цингулид имеется под параконидом с буккальной стороны и в задней части коронки

с лингвальной стороны. Заднее лезвие протокониды отчетливо выражено, раздваивается у основания. В задней части основания коронки имеется отчетливый выступ, сходный с рудиментом талонида. На лингвальной стенке основания коронки между параконидом и протоконидом напротив хищнической вырезки (вид с окклюзиальной стороны) имеется небольшая выпуклость, дистальнее которой лингвальный край отчетливо прогнутый.

Размеры m1 и нижней челюсти приведены в табл. 1.

Из сравнения можно исключить представителей Machairodontinae ввиду их значительных отличий в форме и размерах m1 (см. [14, 15]). Размеры m1 и нижней челюсти рыси *Lynx issiodorensis* [16] не перекрываются с соответствующими параметрами плейстоценовых гепардов [9]. Самые древние остатки *Panthera pardus* (Linnaeus, 1758) в Европе происходят из нижнего плейстоцена пещеры Валлоне во Франции (возраст около 1.2 млн л.н.); в более древних отложениях леопард не отмечен [17].

В Европе на протяжении раннего и среднего плейстоцена одновременно обитали *Acinonyx pardinensis* и *Panthera gombaszoegensis* (Kretzoi, 1938), их остатки обнаружены совместно минимум в семи местонахождениях [8]. Несмотря на то, что *Panthera gombaszoegensis* превосходила по размерам *A. pardinensis*, m1 пантер иногда демонстрирует довольно мелкие размеры [18, 19], попадающие в пределы изменчивости размеров m1 гепардов. Однако даже самые мелкие изученные особи *Panthera gombaszoegensis* (из местонахождения Эскель во Франции) по высоте нижней челюсти за m1 (пределы 26.2–33.0 мм, 6 экз., по [18]) заметно превосходят *A. pardinensis* из Тавриды (24.3 мм, см. табл. 1).

В связи с вышеизложенным, в табл. 1 приведено сравнение размеров *A. pardinensis* (длины и ширины m1, длины параконида и протокониды m1, высоты нижней челюсти за m1) и *Puma pardoides*, плейстоценового вида среднеразмерных кошек, морфологически и генетически достаточно близкого к гепардам. Распределение образцов

Таблица 1. Размеры m1 и высота нижней челюсти *Acinonyx pardinensis* (Croizet et Jobert, 1828) и *Puma pardoides* (Owen, 1846), в мм

Вид	Местонахождение	Коллекция, экз.	Lm1	Wm1	Lm1pa	Lm1pr	H/m1
<i>A. pardinensis</i>	Этуэр	IPS 17126 M-15	24.37	10.58	11.92	12.67	30.96
<i>A. pardinensis</i>	Сен-Валье	IPS 17102 QSV1126	20.06	11.49	10.60	10.10	21.74
<i>A. pardinensis</i>	Сен-Валье	StV 272	19.00	9.60	10.10	8.90	25.80
<i>A. pardinensis</i>	Сен-Валье	StV 20161828	20.70	10.60	10.50	11.80	29.10
<i>A. pardinensis</i>	Сен-Валье	StV 161822	19.00	10.90	10.20	11.95	26.50
<i>A. pardinensis</i>	Сен-Валье	StV 161822	19.80	11.10	9.10	11.50	27.30
<i>A. pardinensis</i>	Сен-Валье	StV 20161819	18.50	9.30	10.10	9.20	26.00
<i>A. pardinensis</i>	Унтермасфельд	IQW 1980/15503	23.90	10.30	11.20	10.50	33.00
<i>A. pardinensis</i>	Унтермасфельд	IQW 1980/15503	23.40	10.00	11.10	10.20	32.80
<i>A. pardinensis</i>	Вильярройя	IPS 35087	21.44	8.86	12.41	11.37	29.54
<i>A. pardinensis</i>	пещера Таврида	ИЭРЖ, № 727/2261	20.90	9.50	10.70	12.10	24.30
<i>P. pardoides</i>	пещера Виктория	IPS 4144	18.59	8.90	11.26	7.59	—
<i>P. pardoides</i>	Ла-Пуэбла-де-Вальверде	IPS 36127	19.80	8.90	12.40	8.50	—
<i>P. pardoides</i>	Сен-Валье	StV 161854	18.70	8.30	10.50	9.10	28.30
<i>P. pardoides</i>	Сен-Валье	StV 161853	15.60	7.60	6.60	8.80	23.40
<i>P. pardoides</i>	Сен-Валье	StV 161855	18.40	8.00	8.70	9.10	27.70
<i>P. pardoides</i>	Сен-Валье	StV 137	16.30	7.80	9.80	8.50	—
<i>P. pardoides</i>	Сен-Валье	StV 138	18.90	8.20	10.06	8.98	—
<i>P. pardoides</i>	Странска Скала	Без номера	17.00	8.40	—	—	—
<i>P. pardoides</i>	Тассо	IGF 851	22.10	10.10	12.30	11.60	34.30
<i>P. pardoides</i>	Унтермасфельд	IQW 1983/18556	16.90	7.90	10.50	8.20	26.00

Сокращения: H/m1 – высота нижней челюсти за m1; Lm1 – длина m1; Lm1pa – длина параконида m1; Lm1pr – длина протокониды m1; Wm1 – ширина m1; организации: IGF – Музей палеонтологии Флорентийского университета, Флоренция, Италия; IPS – Каталонский институт палеонтологии Микеля Крусифона, Сабадель, Испания; IQW – Научно-исследовательская станция четвертичной палеонтологии в Веймаре, Германия; StV – коллекция Сен-Валье Музея естествознания и антропологии в Лионе, Франция

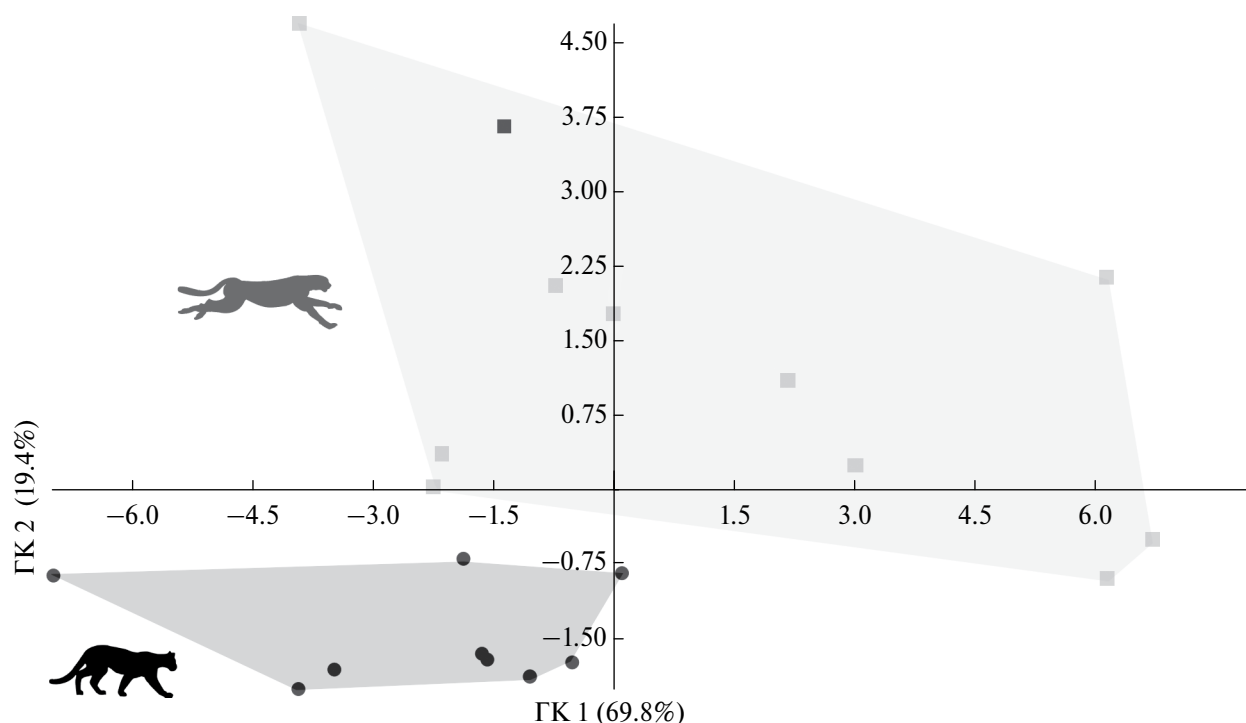


Рис. 2. Распределение образцов (см. табл. 1) *Acinonyx pardinensis* (Croizet et Jobert, 1828) и *Puma pardoides* (Owen, 1846) в пространстве двух главных компонент. Круги — *P. pardoides*; квадраты — *A. pardinensis*: серые — экземпляры из различных местонахождений Европы, черный — экз. ИЭРЖ, № 727/2261 из пещеры Таврида.

в пространстве двух главных компонент представлено на рис. 2, где экземпляры *A. pardinensis* образуют облако, не перекрывающееся с таковым *Puma pardoides*. Экз. ИЭРЖ, № 727/2261 из местонахождения Таврида находится в зоне распределения образцов *A. pardinensis* и значительно дистанцирован от зоны *Puma pardoides*.

По морфологии m1 экз. ИЭРЖ, № 727/2261 имеет небольшое сходство с *Puma pardoides* (см. [20]), выраженное в наличии высокого протокониды и значительном наклоне передней стенки паракониды. По другим характеристикам m1 экз. ИЭРЖ, № 727/2261 соответствует *A. pardinensis*. В числе этих признаков более массивный m1, сильнее выраженный задний выступ в основании задней стенки протокониды, хорошо заметные выпуклость и изгиб лингвального края основания коронки. Выпуклость в лингвальной части коронки m1 между параконидом и протоконидом имеется у 85–90% особей *A. pardinensis* [9].

Acinonyx pardinensis в целом демонстрирует тенденцию к наличию более широкого m1, а *Puma pardoides* — более узкого. Также у *Puma pardoides* более грацильная нижняя челюсть с низкой горизонтальной ветвью, тогда как у *A. pardinensis* нижняя челюсть более массивная и высокая. Таким образом, экз. ИЭРЖ, № 727/2261 из Тавриды обладает всеми признаками для его надежной идентификации как

A. pardinensis. Это находка дополняет состав ассоциации крупных хищников фауны пещеры Таврида и является первым свидетельством обитания гепардов в Крыму в раннем плейстоцене.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Г.В. Самохина и Б.А. Вахрушева (Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь) за помощь в организации и проведении экспедиционных работ в пещере Таврида. Авторы выражают искреннюю благодарность А.Ю. Пузаченко (Институт географии РАН, Москва) за предоставленную информацию о распространении находок раннеплейстоценовых хищных млекопитающих, а также Д.А. Захарову (Уральский федеральный университет имени первого президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург) за техническую помощь.

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/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В исследовании использовались только ископаемые материалы. Работы с живыми животными не проводились.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

У авторов нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Werdelin L., Lewis M.E. *Koobi for a research project. V. 7. Carnivora*. San Francisco: California Academy of Sciences, 2013.
2. Van Valkenburgh B., Pang B., Cherin M., Rook L. The cheetah: evolutionary history and paleoecology. In: *Cheetahs: biology and conservation*. Amsterdam: Elsevier Inc., 2018. P. 25–32.
3. Schmidt-Küntzel A., Dalton D.L., Menotti-Raymond M. et al. Conservation genetics of the cheetah: genetic history and implications for conservation. In: *Cheetahs: biology and conservation*. Amsterdam: Elsevier Inc., 2018. P. 71–92.
4. Zhang K., Shen X.-L., Liu K.-Z. et al. The modern classification of Felidae – combining molecular phylogeny framework and fossil evidence // *Chinese Journal of Zoology*. 2023. V. 58. № 1. P. 1–29.
5. Cherin M., Iurino D.A., Sardella R., Rook L. *Acinonyx pardinensis* (Carnivora, Felidae) from the Early Pleistocene of Pantalla (Italy): predatory behavior and ecological role of the giant Plio–Pleistocene cheetah // *Quaternary Science Reviews*. 2014. V. 87. P. 82–97.
6. Werdelin L., Peigné S. *Carnivora*. In: *Cenozoic Mammals of Africa*. Berkeley and London: University of California Press, 2010. P. 603–658.
7. Geraads D. How old is the cheetah skull shape? The case of *Acinonyx pardinensis* (Mammalia, Felidae) // *Geobios*. 2014. V. 47. P. 39–44.
8. Cherin M., Iurino D.A., Zanatta M. et al. Synchrotron radiation reveals the identity of the large felid from Monte Argentario (Early Pleistocene, Italy) // *Scientific Reports*. 2018. V. 8. Art. 8338. P. 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26698-6>
9. Jiangzuo Q., Wang Y., Madurell-Malapeira J. et al. Massive early Middle Pleistocene cheetah from eastern Asia shed light onto the evolution of *Acinonyx* in Eurasia // *Quaternary Science Reviews*. 2024. V. 332. Art. 108661. P. 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2024.108661>
10. Hemmer H., Kahlke R.D. New results on felids from the Early Pleistocene site of Untermassfeld. In: *The Pleistocene of Untermassfeld near Meiningen (Thüringen, Germany). Part 5*. Mainz: Verlag des Römisch-Germanischen Zentralmuseums, 2022. P. 1465–1566.
11. 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.
12. Gimranov D., Lavrov A., Prat-Vericat M. et al. *Ursus etruscus* from the late Early Pleistocene of the Taurida cave (Crimean Peninsula) // *Historical Biology*. 2023. V. 35. № 6. P. 843–856.
13. Сотникова М.В., Байгушева В.С., Тумов В.В. Хищные млекопитающие ханжовского фаунистического комплекса и их стратиграфическое значение // *Стратиграфия. Геологическая корреляция*. 2002. Т. 10. № 4. С. 62–78.
14. Palmqvist P., Torregrosa V., Pérez-Claros J.A. et al. A re-evaluation of the diversity of *Megantereon* (Mammalia, Carnivora, Machairodontinae) and the problem of species identification in extinct carnivores // *Journal of Vertebrate Paleontology*. 2007. V. 27. № 1. P. 160–175.
15. Antón M., Salesa M.J., Galobart A., Tseng Z.J. The Plio-Pleistocene scimitar-toothed felid genus *Homotherium* Fabrini, 1890 (Machairodontinae, Homotheriini): diversity, palaeogeography and taxonomic implications // *Quaternary Science Reviews*. 2014. V. 96. P. 259–268.
16. Mecozzi B., Sardella R., Boscaini A. et al. The tale of a short-tailed cat: new outstanding Late Pleistocene fossils of *Lynx pardinus* from southern Italy // *Quaternary Science Reviews*. 2021. V. 262. Art. 106840. P. 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2021.106840>
17. Ghezzi E., Rook L. The remarkable *Panthera pardus* (Felidae, Mammalia) record from Equi (Massa, Italy): taphonomy, morphology, and paleoecology // *Quaternary Science Reviews*. 2015. V. 110. P. 131–151.
18. Bonifay M.F. *Carnivores quaternaires du Sud-Est de la France*. Paris: Muséum national d'Histoire naturelle, 1971.
19. Mol D., Logchem W. van, Vos J. de. New record of the European jaguar, *Panthera onca gombaszoegensis* (Kretzoi, 1938), from the Plio-Pleistocene of Langenboom (The Netherlands) // *Cainozoic Research*. 2011. V. 8. P. 35–40.
20. Viret J. Le loess à bancs durcis de Saint-Vallier (Drôme), et sa faune de mammifères villafranchiens // *Nouvelles Archives du Muséum d'Histoire naturelle de Lyon*. 1954. V. 4. P. 1–200.

**CHEETAH *ACINONYX PARDINENSIS* (FELIDAE, CARNIVORA)
FROM THE EARLY PLEISTOCENE OF CRIMEA (TAURIDA CAVE)**

**D. O. Gimranov^a, J. Madurell-Malapeira^b, Q. Jiangzuo^c,
A. V. Lavrov^d, Academician of the RAS A. V. Lopatin^d**

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

^b*Earth Science Department, University of Florence, Florence, Italy*

^c*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*

^d*Borissiak Paleontological Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

A mandible fragment of *Acinonyx pardinensis* (Croizet et Jobert, 1828) is described from the Early Pleistocene locality in the Taurida cave (Crimea, Late Villafranchian, about 1.8–1.5 Ma). This is the first discovery of the genus *Acinonyx* in the Pleistocene of Crimea. Along with other felids, such as *Homotherium*, *Megantereon*, *Panthera*, *Lynx*, and *Puma*, cheetahs were typical representatives of the Late Villafranchian faunas of Eurasia. In the Taurida locality, *Acinonyx pardinensis* is co-occurred with *Homotherium crenatidens*, *Megantereon adroveri*, and *Lynx issiodorensis*.

Keywords: *Acinonyx pardinensis*, felids, Late Villafranchian, Taurida cave, Crimea

УДК 577.115.3 + 577.359

СОСТАВ И СОДЕРЖАНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ АЛТАЙСКОГО ОСМАНА ПОТАНИНА *OREOLEUCISCUS POTANINI* (CYPRINIFORMES, ACTINOPTERIGII) ИЗ ВОДОХРАНИЛИЩ МОНГОЛИИ

© 2024 г. Академик РАН Ю. Ю. Дгебуадзе^{1, *}, член-корреспондент РАН Н. Н. Сушик^{2, 3},
Б. Мэндсайхан (B. Mendsaikhan)⁴, Д. Алтансукх (D. Altansukh)⁵,
А. Ю. Емельянова², член-корреспондент РАН М. И. Гладышев^{2, 3}

Поступило 25.04.2024 г.

После доработки 05.05.2024 г.

Принято к публикации 07.05.2024 г.

Впервые исследованы состав жирных кислот в мышечной ткани уникальных центральноазиатских карпообразных рыб: алтайского османа Потанина *Oreoleuciscus potanini*. Рассмотрены популяции этих рыб в водохранилищах полупустынной зоны (Дургунском и Тайширском) в период их формирования. Показано, что содержание эйкозапентаеновой (ЭПК) и докозагексаеновой (ДГК) кислот *O. potanini* соответствует медианному значению этой величины в отряде Карпообразных. Установлено, что основу пищевой сети растительной формы данного вида составляют микроводоросли: диатомеи, эвглены и, возможно, хризифиты, а также бактерии. При этом уровни биомаркеров бактерий, 15-17РЖК и 17:0 были достоверно выше у рыб в Дургунском водохранилище, а уровень ЭПК (биомаркера диатомей) — у *O. potanini* Тайширского водохранилища. Установленные более высокие величины содержания тяжелого изотопа азота в мышцах *O. potanini* из Тайширского водохранилища, скорее всего связаны с еще не сформировавшимися бентосными сообществами и с незавершившейся диверсификацией речной формы алтайского османа Потанина в озерные формы.

Ключевые слова: эйкозапентаеновая кислота (ЭПК), докозагексаеновая кислота (ДГК), стабильные изотопы, *Oreoleuciscus potanini*, водохранилища, пищевые сети

DOI: 10.31857/S2686738924050131

Рыба, как известно, является основным пищевым источником длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот семейства омега-3 (ПНЖК) — протекторов сердечно-сосудистых заболеваний человека [1, 2]. Кроме того, рыбы являются

компонентом питания некоторых наземных животных и обеспечивают тем самым перенос на сушу ПНЖК и других важных для пищевых сетей веществ, производимых в водных экосистемах. Однако, содержание ПНЖК, а именно суммы эйкозапентаеновой (20:5n-3, ЭПК) и докозагексаеновой (22:6n-3, ДГК) кислот в съедобной биомассе (мышечной ткани) разных видов рыб различается в 300 раз, то есть, далеко не все рыбы являются реальным пищевым источником этих биологически активных веществ [3]. Содержание ЭПК и ДГК в биомассе рыб определяется комплексом филогенетических и экологических факторов, однако, конкретные механизмы и соотношение влияния данных факторов известны не в полной мере [3]. Одним из возможных путей изучения указанных механизмов является сбор сведений о содержании ПНЖК в различных видах рыб из разнообразных водных бассейнов для последующего сравнительного анализа [4, 5].

Большой интерес для понимания качественных характеристик трофических взаимодействий

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

²Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск, Россия, Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр СО РАН”, Красноярск, Россия

³Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

⁴Институт географии и геоэкологии академии наук Монголии Institute of Geography and Geocology of Mongolian Academy of Sciences, Ulanbaatar-15170, Mongolia

⁵Западный региональный филиал Монгольского государственного университета Western Regional Branch of National University of Mongolia

*e-mail: yudgeb@yandex.ru

в экосистемах представляют рыбы, обитающие в специфических условиях водоемов семиаридной зоны. Одним из таких объектов являются алтайские османы рода *Oreoleuciscus*, населяющие Центральнoазиатский бессточный бассейн в Монголии. В западной части этого бассейна (Котловине больших озер) обитает алтайский осман Потанина *Oreoleuciscus potanini*, являющийся абсолютным доминантным в рыбном населении рек и озер. Кроме *O. potanini* здесь встречаются только монгольский хариус *Thymallus brevirostris* и 1–2 вида сибирских усатых голцов родов *Orthrias* и *Triplophysa* [6]. Многообразие условий Котловины (пресные и солоноватые озера, малые и средние реки равнин и предгорий), бедное рыбное население, низкая первичная продукция [7] способствовали большой морфологической и экологической изменчивости *O. potanini*. Для этого вида описаны четыре внутривидовые формы: рыбоядная, растительноядная, острорылая и речная, различающиеся по морфологии и образу жизни. По результатам анализа содержимого кишечника, у растительноядной формы в питании преобладают растения, у рыбоядной формы – рыба, у острорылой – планктон, у речной формы – главным образом личинки амфибиотических насекомых. При этом наблюдается большая изменчивость и перекрывание спектров питания форм. В связи с тем, что внутривидовая структура рыб рода *Oreoleuciscus* весьма изменчива по причине циклического образования форм [8] и вариации в соотношении форм в водоеме, представляет интерес выявление механизмов пищевой дифференциации этих рыб при формировании новых местообитаний, в частности водохранилищ. Решить эти вопросы помогают современные подходы: «биомаркеры» (содержание ПНЖК) и анализ стабильных изотопов.

В начале XXI века в Котловине больших озер было построено 2 водохранилища: в 2007 г. – Тайширское на р. Дзабхан (Завхан) (46°41'39"с.ш., 96°39'57" в.д.), и в 2008 г. – Дургунское на протоке Чоно-Харайх, соединяющей озера Хар-Ус и Хар (48°19'33"с.ш., 92°48'25" в.д.). Сведения о водохранилищах и их биоте опубликованы в специальной сводке [9]. Важно отметить, что Дургунское водохранилище получило алтайского османа Потанина с уже образованными внутривидовыми формами из окружающих его озер, в то время как в Тайширском водохранилище формы *O. potanini* начали формироваться после заполнения водохранилища из речной (генерализованной) формы р. Дзабхан.

Цель настоящей работы с помощью современных методик уточнить спектры питания растительноядной формы алтайского османа Потанина и установить их особенности при формировании популяций водохранилищ. Одной из задач работы было определение состава и содержания жирных кислот (ЖК) в биомассе алтайского османа

Потанина из двух водохранилищ Монголии для использования их в качестве меток переноса веществ по пищевым сетям и определения потенциальной питательной ценности для человека двух популяций этих рыб по содержанию ценных ЖК: эйкозопентаеновой (ЭПК) и докозогексаеновой (ДГК).

Пробы рыб были взяты из сетных уловов (ячея 20–60 мм) в Дургунском (46°42.385'с.ш., 96°39.834' в.д.) и Тайширском водохранилищах (46°42.385'с.ш., 96°39.834' в.д.) в августе 2023 г. Рассматривали только представителей растительноядной формы *O. potanini*. Методы отбора проб мышечной ткани, анализа стабильных изотопов и анализа ЖК методом хромато-масс-спектрометрии были описаны ранее [10].

В ходе исследований были впервые получены данные о составе и содержании жирных кислот (ЖК) в биомассе алтайского османа Потанина.

Результаты анализа ЖК алтайского османа Потанина представлены в таблице. Прежде всего стоит отметить относительно высокие уровни жирных кислот –16:1n-7 и ЭПК, которые являются маркерами диатомовых водорослей [11]. Вероятно, диатомеи составляют основу питания растительноядной формы *O. potanini*, причем в Тайширском водохранилище вклад этих водорослей в питание рыб выше, чем в Дургунском (табл. 1). Кроме того, относительно высокие уровни 18:2n-6 и ДГК в алтайском османе Потанина (табл.) могут свидетельствовать о значительном вкладе в их питание эвгленовых водорослей [12]. Уровень 18:2n-6 также может являться маркером вклада высших растений, в том числе наземных [13]. Однако, относительно низкий уровень другого важного биомаркера высших растений – 18:3n-3 и полное отсутствие таких специфических маркеров как насыщенные ЖК с 22–26 атомами углерода [13] позволяют утверждать, что в рационе растительноядной формы *O. potanini* преобладают водоросли.

Высокий уровень ДГК (табл. 1) свидетельствует о наличии в питании эвгленовых и хризифитовых водорослей [12], и о собственном синтезе рыбами этой кислоты из биохимического предшественника – ЭПК. Способность Карпообразных к синтезу ДГК из незаменимых ЖК, получаемых с пищей, была доказана в последние годы [14, 15]. Также заметную долю в общих ЖК растительноядной формы *O. potanini* из обоих водохранилищ составляют биомаркеры бактерий: 15:0, 15–17РЖК (жирные кислоты с разветвленной цепью), 17:0 и $\Sigma 17:1$ [16], что свидетельствует и об их наличии в рационе этих рыб. Следует отметить, что уровни биомаркеров бактерий, 15–17РЖК и 17:0 были достоверно выше у рыб в Дургунском водохранилище, тогда как уровень ЭПК (биомаркера диатомей), напротив, был выше у алтайского османа Потанина Тайширского водохранилища (табл. 1). Вероятно, вышеупомянутые различия свидетельствуют о более высоком

вкладе в основание пищевых сетей экосистем бактерий (детрита) в Дургунском водохранилище и водорослей – в Тайширском водохранилище.

Среднее суммарное содержание ЭПК+ДГК в мышечной ткани (съедобной биомассе) растительной формы алтайского османа Потанина в обоих водохранилищах достоверно не отличалось и составляло около 1 мг на г сырой массы (табл. 1). Подобная величина содержания ЭПК+ДГК соответствует медианной величине для отряда Карпообразных [3]. То есть, питательная ценность алтайского

османа Потанина для человека совпадает с таковой у других рыб данного отряда.

Анализ стабильных изотопов в мышцах растительной формы алтайского османа Потанина показал существенные различия между рыбами двух водохранилищ (рис. 1).

Наблюдаемые достоверно более высокие величины содержания тяжелого изотопа азота в мышцах *O. potanini* из Тайширского водохранилища, возможно, связаны как с особенностями этого водоема (не сформировавшихся еще бентосных сообществ, слабым развитием макрофитов), так и с незавершившейся диверсификацией речной формы алтайского османа Потанина в озерные формы. О последнем свидетельствуют данные, полученные путем анализа кишечных трактов ортодоксальными методами. В Тайширском водохранилище у *O. potanini*, отнесенных к растительной форме, наблюдалось преобладание в питании личинок насекомых, при небольшом (по частоте встречаемости 16,1%) присутствии растительной пищи [9]. Действительно, полученные данные по средним величинам $\delta^{15}\text{N}$ косвенно подтверждают большую долю животной пищи у алтайского османа Потанина из Тайширского водохранилища (рис. 1).

Таким образом, впервые исследованы состав и содержание жирных кислот в мышечной ткани *O. potanini*. Установлено, что основу пищевой сети

Таблица. Состав жирных кислот (ЖК, % от общей суммы, среднее значение $\pm$ стандартная ошибка) и содержание (мг г⁻¹ сырой массы) общей суммы ЖК, а также эйкозапентаеновой (ЭПК) и докозагексаеновой (ДГК) кислот и их суммы в мышечной ткани растительной формы *Oreoleuciscus potanini* из Тайширского (число проб n = 10) и Дургунского водохранилищ (n = 6) в августе 2023 г.; t – критерий Стьюдента, достоверные различия (p<0.05) выделены жирным шрифтом

ЖК	Тайширское	Дургунское	t
12:0	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.0	0.68
14:0	1.6 $\pm$ 0.6	1.2 $\pm$ 0.3	0.91
15:0	0.4 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.70
16:0	17.5 $\pm$ 1.5	17.2 $\pm$ 1.1	0.28
16:1n-9	0.5 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.1	1.51
16:1n-7	6.2 $\pm$ 1.7	5.5 $\pm$ 1.2	0.47
15-17РЖК*	1.4 $\pm$ 0.8	2.4 $\pm$ 0.4	2.57
Σ 16ПНЖК	0.4 $\pm$ 0.6	0.3 $\pm$ 0.2	0.39
17:0	0.6 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	4.03
Σ 17:1	0.5 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.1	0.57
18:0	7.0 $\pm$ 0.6	8.4 $\pm$ 1.1	1.13
18:1n-9	9.2 $\pm$ 1.3	9.2 $\pm$ 0.8	0.04
18:1n-7	6.8 $\pm$ 0.7	6.5 $\pm$ 0.6	0.30
18:2n-6	4.1 $\pm$ 1.4	2.5 $\pm$ 0.3	1.84
18:3n-3	1.4 $\pm$ 0.6	1.4 $\pm$ 0.5	0.00
18:4n-3	0.4 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.1	0.15
20:0	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0	0.52
Σ 20:1	0.7 $\pm$ 0.4	0.7 $\pm$ 0.2	0.15
20:2n-6	0.6 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.0	0.11
20:4n-6	7.0 $\pm$ 0.1	9.6 $\pm$ 1.2	1.84
20:4n-3	0.8 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	1.38
20:5n-3	9.3 $\pm$ 0.9	7.0 $\pm$ 0.4	2.36
22:4n-6	0.4 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	1.93
22:5n-6	0.9 $\pm$ 0.0	1.9 $\pm$ 0.1	4.43
22:5n-3	3.8 $\pm$ 0.0	3.2 $\pm$ 0.2	1.94
22:6n-3	16.2 $\pm$ 0.1	16.2 $\pm$ 1.6	0.01
Сумма, мг г ⁻¹	4.42 $\pm$ 0.51	4.51 $\pm$ 1.96	0.05
ЭПК	0.41 $\pm$ 0.06	0.29 $\pm$ 0.12	0.89
ДГК	0.66 $\pm$ 0.06	0.59 $\pm$ 0.23	0.30
ЭПК+ДГК	1.07 $\pm$ 0.09	0.88 $\pm$ 0.35	0.53

*кислоты с разветвленной цепью.

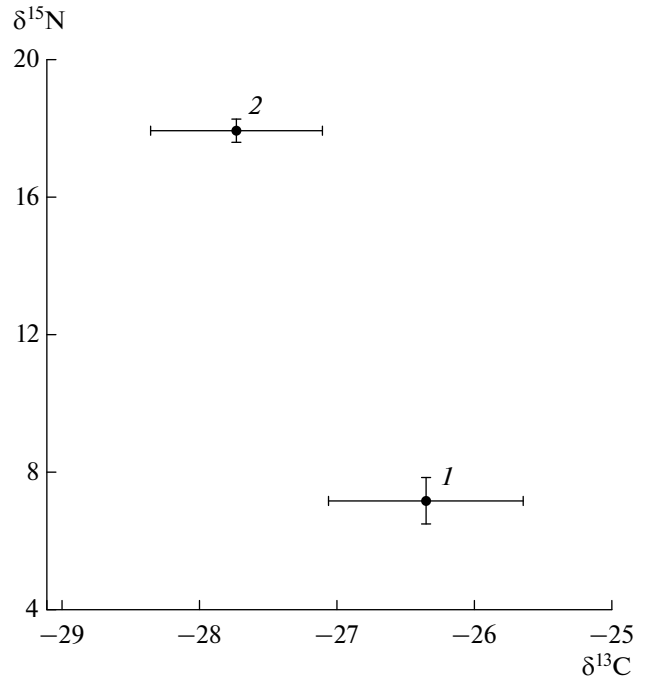


Рис. 1. Содержание стабильных изотопов в Алтайских османах Потанина *Oreoleuciscus potanini* из водохранилищ Монголии в августе 2023 г.: 1 – Дургунское водохранилище; 2 – Тайширское водохранилище. Отрезки прямых обозначают стандартные ошибки средних.

растительной формы данного вида составляют микроводоросли: диатомеи, эвглены и, возможно, хризифиты, а также бактерии. Содержание ЭПК и ДГК — протекторов сердечно-сосудистых заболеваний человека в съедобной биомассе алтайского османа Потанина соответствует медианному значению этой величины в отряде Карпообразных.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет Государственного задания ИПЭЭ РАН № 0109-2018-0076 и Государственного задания Института биофизики СО РАН № FWES-2024-0024. Материал собран в рамках работы Совместной Российско-Монгольской комплексной биологической экспедиции РАН и АНМ. Авторы искренне благодарны начальнику экспедиции С.Н. Баже за содействие в организации работ в Монголии.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Одобрено Институциональным комитетом по этике животных по биомедицинской этике Сибирского федерального университета (Россия). Госстандарт РФ, 33215-2014, 01.07.2016. Код одобрения: Государственный стандарт РФ № 33215-2014.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tocher D.R., Betancor M.B., Sprague M. et al.* Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids, EPA and DHA: bridging the gap between supply and demand // *Nutrients*. 2019. V. 11. № 1. Article 89.
2. *Bernasconi A.A., Wiest M.M., Lavie C.J. et al.* Effect of omega-3 dosage on cardiovascular outcomes: an updated meta-analysis and meta-regression of interventional trials // *Mayo Clin. Proc.* 2021. V. 96. № 2. P. 304–313.
3. *Gladyshev M.I., Sushchik N.N., Tolomeev A.P., Dgebuadze Y.Y.* Meta-analysis of factors associated with omega-3 fatty acid contents of wild fish. // *Rev. Fish Biol. Fish.* 2018. V. 28. P. 277–299.
4. *Harris W.S., Mozaffarian D., Lefevre M. et al.* Towards establishing dietary reference intakes for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. // *J. Nutr.* 2009. V. 139. P. 804S–819S.
5. *Cladis D.P., Kleiner A.C., Freiser H.H., Santerre C.R.* Fatty acid profiles of commercially available finfish fillets in the United States. // *Lipids*. 2014. V. 49. P. 1005–1018.
6. *Dgebuadze Yu., Mendsaihan B., Dulmaa A.* Diversity and distribution of Mongolian fish: Recent state, trends and studies // *Erforsch. Biol. Ress. Mongolei. Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, (Halle/Saale)* 2012. V. 12: 219–230.
7. *Бульон В.В., Никулина В.Н., Степанова В.А., Цаллолихин С.Я., Цэревсамбуу С.* Экосистемы водоемов Центрально-азиатского бассейна // В кн. В кн.: Рыбы Монгольской Народной Республики. М.: Наука, 1983. С. 69–101.
8. *Dgebuadze Yu. Yu.* Central Asian Closed Basin: Unique place of cyclic diversification of fish // *Ecosystems of Central Asia under current conditions of socio-economic development. Proceedings of the international conference. 2015, Ulaanbaatar, Mongolia. General and Experimental Biology MAS. V 2: 29–33.*
9. Водохранилища полупустынной зоны: Западная Монголия / отв. ред. Крылов А.В. — Москва; Ярославль: Филигрань, 2023. — 204 с.; ил. — Биологические ресурсы и природные условия Монголии: Труды Совместной Российско-Монгольской комплексной биологической экспедиции РАН и АНМ; т. 69. ISBN 978-5-6050859-8-0
10. *Gladyshev M.I., Kolmakova O.V., Tolomeev A.P., Anishchenko O.V., Makhutova O.N., Kolmakova A.A., Kravchuk E.S., Glushchenko L.A., Kolmakov V.I., Sushchik N.N.* Differences in organic matter and bacterioplankton between sections of the largest Arctic river: Mosaic or continuum? // *Limnology and Oceanography*. — 2015. — 60. — P. 1314–1331. doi: 10.1002/lno.10097
11. *Dijkman N.A., Kromkamp J.C.* Phospholipid-derived fatty acids as chemotaxonomic markers for phytoplankton: Application for inferring phytoplankton composition // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2006. V. 324. P. 113–125.
12. *Taipale S., Strandberg U., Peltomaa E., Galloway A.W.E., Ojala A., Brett M.T.* Fatty acid composition as biomarkers of freshwater microalgae: analysis of 37 strains of microalgae in 22 genera and in seven classes. // *Aquat. Microb. Ecol.* 2013. V. 71. P. 165–178.
13. *Kelly J.R., Scheibling R.E.* Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs. // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* V. 446. P. 1–22.
14. *Sun S., Ren T., Li X., Cao X., Gao J.* Polyunsaturated fatty acids synthesized by freshwater fish: A new insight to the roles of *elovl2* and *elovl5* in vivo. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020. V. 532. P. 414–419.
15. *Marrero M., Monroig O., Carlos Navarro J., et al.* Metabolic and molecular evidence for long-chain PUFA biosynthesis capacity in the grass carp *Ctenopharyngodon idella*. // *Compar. Biochem. Physiol. A*. 2022. V. 270. Article 111232.
16. *Napolitano G.E.* Fatty acids as trophic and chemical markers in freshwater ecosystems In: *Arts M.T., Wainman B.C.*, Eds. *Lipids in Freshwater Ecosystems*, Springer, New York, 1999, pp. 21–44.

**COMPOSITION AND CONTENT OF FATTY ACIDS
IN MUSCLE TISSUE OF THE POTANIN ALTAI OSMAN
OREOLEUCISCUS POTANINI (CYPRINIFORMES, ACTINOPTERIGII)
FROM MONGOLIAN RESERVOIRS**

**Academician of the RAS Yu. Yu. Dgebuadze^{1, #},
Corresponding Member of the RAS N. N. Sushchik^{2, 3}, B. Mendsaikhan⁴,
D. Altansukh⁵, A. Y. Emelianova², Corresponding Member of the RAS M. I. Gladyshev^{2, 3}**

¹*Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

²*Institute of Biophysics, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center," Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation*

³*Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation*

⁴*Institute of Geography and Geoecology of Mongolian Academy of Sciences, Ulanbaatar-15170, Mongolia*

⁵*Western Regional Branch of National University of Mongolia*

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

The composition of fatty acids in the muscle tissue of the unique Central Asian carp-like fish of the Potanin Altai osman *Oreoleuciscus potanini* was studied for the first time. The populations of these fish in the reservoirs of the semi-desert zone (Durgun and Taishir) during the period of their formation are considered. It was shown that the content of eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids in *O. potanini* corresponds to the median value of this value in the order Cypriniformes. It has been established that the basis of the food web of the herbivorous form of this species consists of microalgae: diatoms, euglens and, possibly, chrysophytes, as well as bacteria. At the same time, the levels of bacterial biomarkers, 15–17BFA and 17:0 were significantly higher in fish in the Durgun reservoir, and the level of EPA (diatom biomarker) in *O. potanini* in the Taishir reservoir. The established higher values of the heavy nitrogen isotope content in the muscles of *O. potanini* from the Taishir reservoir are most likely associated with not yet formed benthic communities and with the incomplete diversification of the river form of the Potanin Altai Osman into lacustrine forms.

Keywords: eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA), stable isotopes, *Oreoleuciscus potanini*, reservoirs, food webs

УДК: 577.25 615.212.3

ИЗУЧЕНИЕ TRPV1-КАНАЛОВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И ИХ ВЛИЯНИЯ НА ТРЕВОЖНОЕ СОСТОЯНИЕ У МЫШЕЙ ICR

© 2024 г. В. М. Павлов^{1, 2}, А. Ю. Федотова^{1, 2}, Я. А. Андреев³,
В. А. Паликов^{1, 2}, И. А. Дьяченко^{1, 2}

Представлено академиком РАН А. Г. Габибовым

Поступило 04.04.2024 г.

После доработки 15.05.2024 г.

Принято к публикации 17.05.2024 г.

Канал TRPV1 играет важную роль в различных структурах нервной системы, включая периферические и центральные нейроны, сенсорные ганглии, спинной мозг и различные участки головного мозга. Он участвует в различных нейрональных процессах, таких как восприятие и передача болевых сигналов. TRPV1 как детектор потенциально опасных сигналов может оказывать существенное влияние на реакции организма на стресс. Подавление активности TRPV1 приводит к уменьшению уровня тревожности у животных, что свидетельствует о участии этого канала в психоэмоциональной регуляции. Пептид APHC3 является высокоэффективным антагонистом канала TRPV1. В ходе данного исследования мы показали, что данный пептид обладает выраженным анксиолитическим эффектом, снижая уровень тревожности у исследуемых животных.

Ключевые слова: TRPV1, APHC3, анксиолитическое действие, мыши ICR, in vivo

DOI: 10.31857/S2686738924050145

ВВЕДЕНИЕ

Канал TRPV1 (ранее известный как ваниллоидный рецептор 1) играет важную роль в ощущении боли и передаче сенсорной информации. TRPV1 воспринимает различные стимулы, такие как высокая температура, капсаицин и изменение pH. Активация TRPV1 приводит к открытию поры канала, что инициирует передачу сигнала и приводит к различным физиологическим эффектам. TRPV1 обнаруживается в телах нейронов, дендритах, астроцитах и перичитах [1]. Полимодальные свойства TRPV1, позволяющие ему реагировать на разнообразные раздражители, а также его взаимодействие с другими рецепторами и каналами, предполагают его возможную роль в реакциях тревожности и стресса.

Присутствие канала TRPV1 в клетках центральной нервной системы указывает на функции, которые могут быть связаны не только с восприятием и передачей сенсорной информации [2].

Сама по себе тревожность — мультимодальный феномен и может быть вызвана факторами различной этиологии, такими как стресс, гормональные изменения, генетические факторы и хронические заболевания. Эти факторы приводят к появлению стресс-реакций, что в свою очередь может вызвать разнообразные патологические изменения в организме. Одно из таких изменений это выработка провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-1 β , TNF- α) [3]. Некоторые исследования показали, что TRPV1 экспрессируется в микроглии в ответ на раздражители, что приводит к увеличению выделения провоспалительных цитокинов данными клетками. [4, 5]. Ингибирование TRPV1 в ЦНС при помощи инъекции антагониста этого канала в медиальную префронтальную кору приводит к уменьшению тревоги у крыс [6]. Мыши нокаутные по гену TRPV1 проявляют меньше тревожности и уменьшенные реакции на страх, которые связаны с уменьшением долгосрочной потенциации, что подтверждает связь между TRPV1 и развитием страха [7, 8]. В этом исследовании мы анализировали эффективность APHC3 (пептидного

¹Филиал Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Московская область, Пущино, Россия

²Пущинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Пущино, Россия

³Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия
e-mail: v.m.pavlov29@gmail.com

антагониста TRPV1) на моделях острого стресса, таких как помещение животного на приподнятый крестообразный лабиринт и в установку светлая/темная-камера [9]. Пептид АРНСЗ, исходно был выделен из морской анемоны *Heteractis crispa*, как антагонист TRPV1 канала [10, 11]. Было показано, что введение пептида АРНСЗ оказывает противовоспалительный и анальгетический эффект на моделях ревматоидного и остеоартрита, острой боли и хронической боли [10–13]. Также данный пептид обладает нейропротективной активностью в исследовании на клеточных моделях нейродегенерации [14].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследований использовался пептид АРНСЗ, полученный гетерологической экспрессией в *E.coli* [15].

Исследование проведено на базе лаборатории биологических испытаний Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. В основе дизайна исследования лежали рекомендации “Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств” [16]. Для проведения исследования было взято 80 самцов мышей белых половозрелых мышей аутбредной линии ICR статуса SPF 20–30 граммов, возраст 7–8 недель (НПП Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН). Все процедуры были одобрены комиссией ФИБХ РАН по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных (протокол-заявка № 891/22).

Все животные были разделены на 5 групп по 16 животных в соответствии с вводимыми препаратами. Всем группам животных тестируемые препараты вводились внутримышечно в объеме 2 мл/кг. Животным из группы 1 вводили физраствор (0,9% NaCl, «Обновление», Россия). Животные из групп 2–4 получали пептид АРНСЗ в дозах 0,01 мг/кг, 0,1 мг/кг и 1 мг/кг соответственно. Дозы для пептида были выбраны исходя из ранее опубликованных исследований по изучению анальгетической и противовоспалительной активности [10–13]. Пятой группе был введен препарат сравнения Афобазол® в дозе 2,4 мг/кг. Данная доза выбрана после пересчета эффективной дозы 30 мг/сут для человека. В каждой группе 8 животных подвергнуты тесту приподнятого крестообразного лабиринта, а другие 8 были использованы в тесте светлой/темной-камеры. Все функциональные тесты проводились через 30 минут после введения веществ.

В качестве поведенческих тестов были использованы тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» и тестирование в светлой/темной-камере. Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

основан на инстинктивном предпочтении грызунами темных нор, естественного страха нахождения на открытых площадках и падения с высоты. К регистрируемым в “Приподнятом крестообразном лабиринте” показателям уровня тревожности относились число выходов и длительность пребывания животных в открытых рукавах (“открытые” выходы), а также соотношение времени и количества выходов в открытые и закрытые рукава.

Методика светлой/темной-камеры установки TSE Multiconditioning System (TSE Systems, Германия) также использует естественное стремление грызунов избегать ярко освещенных мест. Животных помещали в ярко освещенный отсек двухкамерной светло-темной установки и за 5 мин регистрировали число переходов между светлым и темным отсеками, длительность пребывания в светлом и темном отсеках.

Статистический анализ проводился с использованием GraphPad Prism 6.0 для Windows (GraphPad Software, США). Статистические характеристики представлены средними значениями и стандартными отклонения. Значения были подвергнуты сравнению с использованием непараметрического критерия Kruskal–Wallis с последующим применением критерия множественного сравнения Dunn. Значение $p < 0,05$ считалось показателем статистически значимой разницы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт», как и ожидалось, мыши контрольной группы проводили большую часть времени в закрытых зонах лабиринта. Следует отметить, что половина животных не посещала открытые лучи лабиринта. Внутримышечное введение анксиолитического препарата Афобазол® в дозе 2,4 мг/кг приводило к тому, что все мыши посещали открытые рукава лабиринта и проводили в открытых зонах достоверно больше времени (рис. 1). Таким образом, модель адекватна для тестирования анксиолитической активности. Пептид АРНСЗ в дозах 0,01 мг/кг и 1 мг/кг проявил значительную анксиолитическую активность — открытые рукава посещали 75% животных, и они провели в открытых зонах значительно больше времени (рис. 1А). Время пребывания животных в открытых зонах у животных, которые получили дозы 0,01 мг/кг и 1 мг/кг, относительно контрольной группы, увеличивалось на 158,4 и 179,4% соответственно (рис. 1А). Тогда как, взаимодействия мышей с открытыми зонами площадки увеличивалось на 113,9% (доза 0,01 мг/кг) и 110,5% (доза 1 мг/кг) относительно контрольной группы (рис. 1Б). Группа животных, получавших дозу 0,1 мг/кг АРНСЗ, также демонстрировала увеличение времени пребывания в открытых

зонах и взаимодействия с открытыми площадками, однако этот эффект не отличался от результатов контрольной группы, в то же время не наблюдается и статистически значимого отличия от группы животных, получавших афобазол.

Анксиолитический эффект был подтвержден в тесте светлой/темной-камеры. Введение Афобазола® (2,4 мг/кг), 0,01 мг/кг и 1 мг/кг пептида АРНС3 достоверно увеличивало число переходов животных между отсеками и время нахождения в светлой камере (рис. 2). Афобазол увеличивал время

нахождения в светлой камере, относительно контрольной группы на 15%, тогда как введение АРНС3 в дозах 0,01 мг/кг и 1 мг/кг на 20% и 30%, соответственно (рис. 2А). Число переходов между отсеками достоверно увеличилось контрольной группы для афобазола на 54%, для АРНС3 в дозах 0,01 мг/кг и 1 мг/кг на 81% и 56% соответственно (рис. 2Б). Также наблюдалось увеличение времени нахождения в светлой камере для АРНС3 в дозах 0,01 мг/кг и 1 мг/кг относительно препарата сравнения Афобазол®, но значимых отличий обнаружено не было.

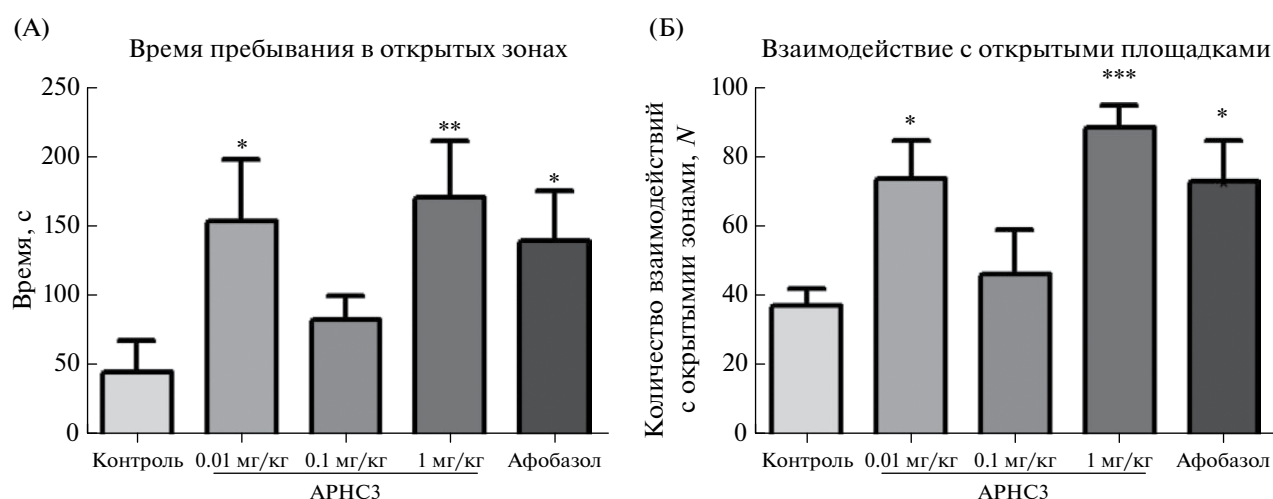


Рис. 1. Результаты теста приподнятого крестообразного лабиринта. Время пребывания в открытых зонах (А) и взаимодействие с открытыми зонами крестообразного лабиринта (Б). Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SD; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ по сравнению с группой контроля. Статистический анализ проводился с использованием критерия Kruskal–Wallis, за которым следовал критерий множественных сравнений Dunn.

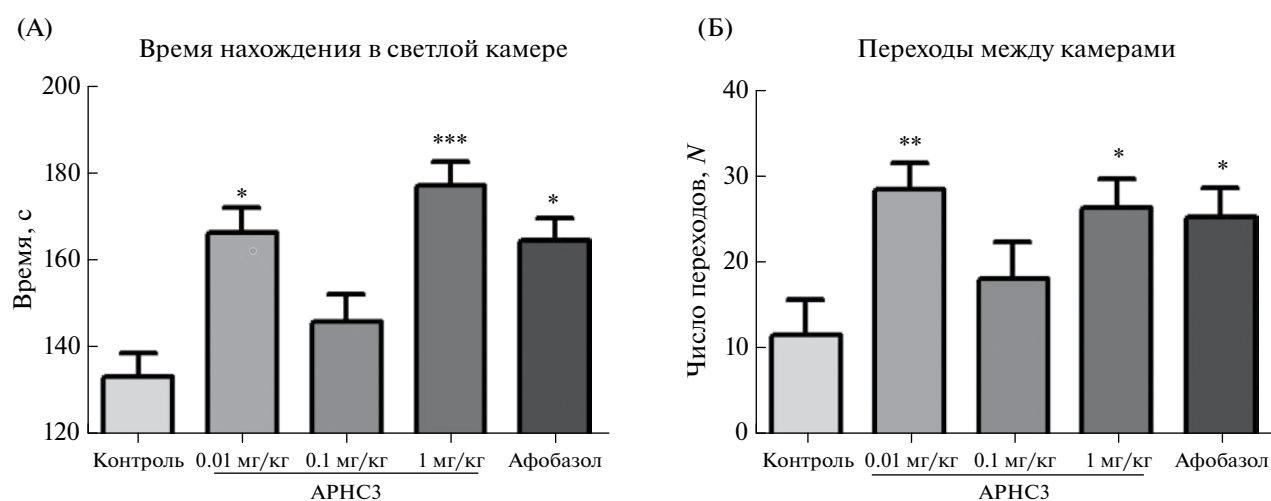


Рис. 2. Результаты теста светлой/темной-камеры. Время нахождения в светлой камере (А), переходы между камерами (Б). Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SD; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ по сравнению с группой контроля. Статистический анализ проводился с использованием критерия Kruskal–Wallis, за которым следовал критерий множественных сравнений Dunn.

Таким образом, пептид АРНСЗ оказывает значительный анксиолитический эффект при внутримышечном введении. В проведенных тестах он проявил себя немного эффективней, чем анксиолитический препарат афобазол. Следовательно, помимо уже известной анальгетической, противоспалительной и нейропротекторной активности можно рассматривать этот пептид как основу для анксиолитических средств. В результате проведенных экспериментов были выявлены эффективные дозы, в которых АРНСЗ обладает выраженным анксиолитическим эффектом, снижая уровень тревожности у животных, что важно для дальнейших исследований пептида в хронических стрессовых состояниях.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета лаборатории биологических испытаний Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных одобрены комиссией ФИБХ РАН по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных (протокол-заявка № 891/22 от 17.05.2022).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Martins, D et al.* "Hotheaded": the role OF TRPV1 in brain functions". // *Neuropharmacology* vol. 85 (2014) P. 151–157.
2. *Ho, Karen W et al.* "TRPV1: a stress response protein in the central nervous system." // *American journal of neurodegenerative disease* vol. 1,1 (2012) P. 1–14.
3. *Nater, Urs M et al.* "Biomarkers of stress in behavioural medicine". // *Current opinion in psychiatry* vol. 26,5 (2013): 440–5.
4. *Marchalant Yannick et al.* "Cannabinoids attenuate the effects of aging upon neuroinflammation and neurogenesis". // *Neurobiology of disease* vol. 34,2 (2009): 300–7.
5. *Marrone Maria Cristina et al.* "TRPV1 channels are critical brain inflammation detectors and neuropathic pain biomarkers in mice." // *Nature communications* vol. 8 15292. 10 May. 2017,
6. *Aguiar Daniele C et al.* "Anxiolytic-like effects induced by blockade of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels in the medial prefrontal cortex of rats." // *Psychopharmacology* vol. 205,2 (2009) P. 217–225.
7. *Marsch Rudolph et al.* Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. // *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 27,4 (2007) P. 832–839.
8. *Brown Travis E et al.* "Loss of interneuron LTD and attenuated pyramidal cell LTP in Trpv1 and Trpv3 KO mice". // *Hippocampus* vol. 23,8 (2013) P. 662–71.
9. *Atrooz Fatin et al.* "Understanding stress: Insights from rodent models". // *Current research in neurobiology* vol. 2 100013. 23 May. 2021
10. *Andreev Yaroslav A et al.* "Polypeptide modulators of TRPV1 produce analgesia without hyperthermia". // *Marine drugs* vol. 11, 12 P. 5100–5115. 16 Dec. 2013
11. *Kozlov S. A., et al.* "New polypeptide components from the *Heteractis crispa* sea anemone with analgesic activity". // *Russian journal of bioorganic chemistry* 35 (2009) P.711–719.
12. *Logashina Yulia A et al.* "Anti-Inflammatory and Analgesic Effects of TRPV1 Polypeptide Modulator АРНСЗ in Models of Osteo- and Rheumatoid Arthritis". // *Marine drugs* vol. 19,1 P.39. 17 Jan. 2021
13. *Garami A et al.* "TRPV1 antagonists that cause hypothermia, instead of hyperthermia, in rodents: Compounds' pharmacological profiles, in vivo targets, thermoeffectors recruited and implications for drug development". // *Acta physiologica (Oxford, England)* vol. 223,3 (2018): e13038. doi:10.1111/apha.1303
14. *Kolesova Y.S., Stroylova Y.Y., et al.* "Modulation of TRPV1 and TRPA1 Channels Function by Sea Anemones' Peptides Enhances the Viability of SH-SY5Y Cell Model of Parkinson's Disease". // *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(1):368.
15. *Esipov Roman S. et al.* "Pilot production of the recombinant peptide toxin of *Heteractis crispa* as a potential analgesic by intein-mediated technology". // *Protein expression and purification* vol. 145 (2018): 71–76.
16. *Миронов А.Н. и др.* Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. // М.: Гриф и К. – 2012. – Т. 944.

THE STUDY OF TRPV1 CHANNELS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM AND THEIR EFFECT ON ANXIETY IN ICR MICE

V. M. Pavlov^{1, 2}, A. Yu. Fedotova^{1, 2}, Y. A. Andreev³, V. A. Palikov^{1, 2}, I. A. Dyachenko^{1, 2}

¹*Branch of Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russian Federation*

²*Pushchino Branch of Russian Biotechnological University, Pushchino, Russian Federation*

³*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russian Federation*

e-mail: v.m.pavlov29@gmail.com

Presented by Academician of the RAS A.G. Gabibov

The TRPV1 channel is actively involved in various neuronal processes and is found in various structures of the nervous system, including peripheral and central neurons, sensory ganglia, spinal cord and various parts of the brain. Due to its ability to respond to various stimuli, TRPV1 can have a significant impact on the body's responses to stress. Studies indicate the involvement of TRPV1 in the regulation of anxiety behavior. Suppression of TRPV1 activity leads to a decrease in the level of anxiety in animals, which indicates the importance of this channel in psychoemotional regulation. A promising compound for inhibiting this channel is the APHC3 peptide, which is a selective receptor antagonist. The results obtained in the course of our study show that this peptide has a pronounced anxiolytic effect, reducing the level of anxiety in the studied animals.

Keywords: TRPV1, APHC3, anxiolytic effect, ICR mice, *in vivo*

УДК 577.3:599.323.4

ИССЛЕДОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И ИНДУКЦИИ РАДИАЦИОННОГО АДАПТИВНОГО ОТВЕТА В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

© 2024 г. Член-корреспондент РАН В. Е. Балакин¹, О. М. Розанова²,
Н. С. Стрельникова^{1, *}, Е. Н. Смирнова², Т. А. Белякова^{2, 3}

Поступило 17.04.2024 г.

После доработки 30.04.2024 г.

Принято к публикации 06.05.2024 г.

Исследовали радиочувствительность к низким и средним дозам рентгеновского излучения (РИ) и способность к индукции радиационного адаптивного ответа (РАО) при облучении *in vitro* лимфоцитов периферической крови пациентов с онкологическими заболеваниями. Критерием цитогенетического повреждения служила частота микроядер (МЯ) в цитохалазин-блокированных двуядерных лимфоцитах в культуре. Было обнаружено, что спонтанный уровень цитогенетических повреждений в лимфоцитах пациентов в 2.6 раза выше, чем у здоровых волонтеров, а также наблюдалась значительная межиндивидуальная вариабельность значений по сравнению с контрольной когортой. Не было выявлено различий в средних значениях по радиочувствительности к низким и средним дозам РИ между исследуемыми группами. Показано отсутствие корреляции между спонтанным уровнем МЯ в лимфоцитах и радиочувствительностью индивидуумов в обеих группах. РАО индуцировался с той же частотой и в той же степени в лимфоцитах как больных, так и здоровых индивидуумов.

Ключевые слова: радиочувствительность, радиационный адаптивный ответ, лимфоциты человека, рак, микроядра, ионизирующее излучение

DOI: 10.31857/S2686738924050153

В последние годы активно исследуется клиническое применение ряда специфических немишен-ных эффектов, которые были обнаружены при изучении действия малых доз радиации на живые объекты [1]. Наибольший интерес из них представляет феномен радиационного адаптивного ответа (РАО), который проявляется в том, что предварительное облучение биологических объектов

в малых дозах ионизирующего излучения повышает устойчивость организма к последующему воздействию в больших повреждающих дозах радиации или других генотоксических веществ [2]. Способность к индукции РАО показана в настоящее время на организменном уровне *in vivo* на представителях практически всех таксономических уровней животного и растительного мира. Поскольку индукция РАО приводит к снижению повреждения на 40–75%, что сравнимо или превосходит эффективность современных химических протекторов, то многими исследователями РАО рассматривается как способ повышения общей устойчивости организмов не только к неблагоприятным факторам окружающей среды, но и как метод защиты здоровых тканей и органов при радиотерапии рака, сахарном диабете, модуляции воспалительных иммунных реакций при острых и хронических заболеваниях опорно-двигательного аппарата и иммунодефицитных состояниях [3]. Ранее нами на линии мышей SHK были подобраны условия

¹Филиал “Физико-технический центр” Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физического института им. П.Н. Лебедева Российской академии наук, Протвино, Россия

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

³Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт физики высоких энергий имени А.А. Логанова Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Протвино, Россия

*e-mail: strelnikova.ns@lebedev.ru

для индукции РАО, который сохранялся на протяжении всей жизни животных и приводил к снижению спонтанного уровня цитогенетических повреждений, связанных со старением, что свидетельствовало о эпигенетических изменениях, которые приводили к повышению стабильности генома [4]. В связи с этим активно продолжают исследования механизмов и закономерностей индукции РАО у человека в условиях *in vivo* и *in vitro*. В ряде работ, проведенных в основном на здоровых донорах, была выявлена большая индивидуальная вариабельность регистрируемых показателей и зависимость от генетических и эпигенетических факторов [1]. Совсем немного публикаций существует о возможности индукции РАО у пациентов в зависимости от диагноза, поскольку, как правило, исследуют только уровень спонтанных повреждений или радиочувствительность клеток. К настоящему моменту показано, что повышенный уровень этих показателей наблюдается у онкологических пациентов, жителей областей с повышенным радиационным фоном и сотрудников предприятий, работающих с радиоактивными материалами [5, 6]. В качестве биомаркера геномной нестабильности в работах по изучению индивидуальной радиочувствительности человека чаще всего используется метод определения количества микроядер (МЯ) в цитохалазин-блокированных двуядерных лимфоцитах (ЦБДЛ), который является чувствительным, воспроизводимым и унифицированным методом, и позволяет быстро оценивать уровень хромосомных повреждений, накапливать индивидуальные данные в течение нескольких лет, объединять и сравнивать результаты разных лабораторий [7].

Целью данной работы являлось исследование радиочувствительности и способности к индукции РАО в лимфоцитах периферической крови пациентов с онкологическими заболеваниями по сравнению со здоровыми донорами.

В исследовании участвовали 31 пациент (24 женщины и 7 мужчин, средний возраст 55 лет) с онкологическими заболеваниями в стадии ремиссии: у большинства женщин был рак молочной железы и яичников, а мужчин — рак простаты и щитовидной железы. Контрольная группа включала 21 здорового волонтера (13 женщин и 8 мужчин, средний возраст — 48 лет). Все участники не имели вредных привычек (курение, алкоголь), придерживались традиционной диеты и образа жизни, а также не подвергались в течение месяца рентгеновским или КТ-обследованиям.

Образцы крови (5 мл) отбирались у волонтеров утром натощак из локтевой вены в стерильные флаконы с гепарином (10 ед/мл). У волонтеров было получено информированное согласие на участие в исследовании, которое проводилось согласно принципам медицинской этики, изложенным в «Этических принципах медицинских

исследований с участием человека Всемирной Медицинской Ассоциации» (Хельсинская декларация 2013) [8], и протокол экспериментов был одобрен Комиссией по биоэтике и биобезопасности ИТЭБ РАН (№ 11/23 от 8 февраля 2023 г.).

Изучение радиочувствительности и индукции РАО проводили при облучении *in vitro* цельной периферической крови человека рентгеновским излучением (РИ). Объем крови делился на аликвоты по 0.5 мл в двух повторениях для следующих вариантов: 1) необлученный контроль; 2) облучение в дозе 10 сГр; 3) облучение в дозе 2 Гр и 4) облучение по схеме РАО: сначала в адаптирующей дозе 10 сГр, а затем через 5 ч — в выявляющей дозе 2 Гр. Дозы облучения были подобраны на основе наших предыдущих исследований индукции РАО на мышцах и лимфоцитах здоровых доноров [9]. Транспортировку образцов крови (около 1 ч) и облучение проводили при комнатной температуре, так как ранее нами при определении цитогенетического повреждения в клетках крови было показано, что радиочувствительность лимфоцитов, облученных при 37°C и 20°C в аналогичных дозах, не зависит от температуры хранения и облучения образцов [10]. Время облучения образцов крови составляло 20–120 с. Источником РИ служила установка РУТ (200 кВ, 2 кВ/мкм, 1 Гр/мин; Центр коллективного пользования «Источники излучения», Институт биофизики клетки РАН, Пушкино).

Условия культивирования клеток и приготовления цитогенетических препаратов лимфоцитов проводили согласно общепринятой методики Фенеша [11]. Критерием повреждения служила частота МЯ в ЦБДЛ. При анализе МЯ в ЦБДЛ использовали критерии, описанные в работе [7]. На каждую экспериментальную точку для отдельного донора подсчитывали не менее 500 ЦБДЛ.

Статистические различия между группами оценивались с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Степень разброса значений внутри группы определяли с помощью коэффициента вариации. Парный корреляционный анализ проводили с помощью корреляции Пирсона.

На рис. 1 показаны спонтанная частота МЯ в ЦБДЛ у онкобольных и здоровых доноров.

Индивидуальные значения частоты МЯ в контрольной группе находились в диапазоне 0.50–2.80%, в группе больных — 1.95–7.30%. Среднее значение спонтанного уровня цитогенетических повреждений у онкобольных в 2.6 раза было выше, чем в контрольной группе, и в группе больных наблюдалась значительная индивидуальная вариабельность значений по сравнению с когортой здоровых доноров. Средние значения ЦБДЛ с МЯ у больных значительно превышали средние значения у здоровых доноров (4.07 и 1.57 соответственно), медианные значения в группах также сильно различались (3.5 и 1.4). Повышенные и сравнимые

по величине спонтанные уровни МЯ в ЦБДЛ были выявлены не только у больных раком, но и у больных сахарным диабетом, заболеваниями щитовидной железы, у сотрудников атомной промышленности, получивших в результате хронического облучения дозу порядка 20 сГр, у медицинского персонала рентгеновских кабинетов и работающих с диагностическими радионуклидами [12]. В многолетнем межлабораторном исследовании 7000 индивидуальных значений спонтанного уровня МЯ в ЦБДЛ было показано, что для условно здоровых людей разного возраста значения находятся в диапазоне 1–6% [13]. В этом и других исследованиях с использованием метода подсчета хромосомных aberrаций не удалось доказать связь роста спонтанного уровня повреждений в лимфоцитах с возрастом человека, курением или проживанием в неблагоприятных экологических условиях, но отмечается связь повышенного спонтанного уровня МЯ в ЦБДЛ (ближе к верхней границе нормы) у индивидуумов с риском индукции онкологических заболеваний [14].

На рис. 2 показаны средние значения количества МЯ (после вычитания спонтанного фона) в лимфоцитах после облучения в дозе 10 сГр. Индивидуальные значения количества МЯ в лимфоцитах контрольной группы находились в диапазоне – 0.7–8.63%, а в группе больных – 1.2–6.67%. Внутригрупповая вариабельность значений в группах была одинаковой.

Средняя чувствительность у онкобольных (2.04) не отличалась от здоровых доноров (2.28). Медианные значения в группах были близки (1.42 и 1.7). Облучение низкой дозой РИ моделирует чувствительность индивидуумов к радиационным нагрузкам, связанных с загрязнением окружающей среды, профессиональной деятельностью, а также при КТ-сканировании, маммографии и других рентгеновских обследованиях, применение которых в диагностике выросло многократно в течение последнего десятилетия. Ранее нами показано, что у пациентов с синдромом вторичного иммунодефицита радиочувствительность лимфоцитов к дозе 10 сГр также не отличалась от таковой у здоровых доноров, но медианные значения у иммунодефицитных доноров было выше в два раза [15].

На рис. 3 представлено количество МЯ (после вычитания спонтанного фона) в лимфоцитах, облученных в дозе 2 Гр, у больных и здоровых индивидуумов. Индивидуальные значения количества МЯ в лимфоцитах контрольной группы находились в диапазоне 5.50–26.10%, а в группе больных – 5.00–31.91%, при этом внутригрупповая вариабельность значений в обеих группах была одинаковой. Средние значения ЦБДЛ с МЯ у онкобольных и условно здоровых достоверно не отличались и были равны 16 и 14.13. Медианные значения в группах были близки (15.34 и 11.94 соответственно).

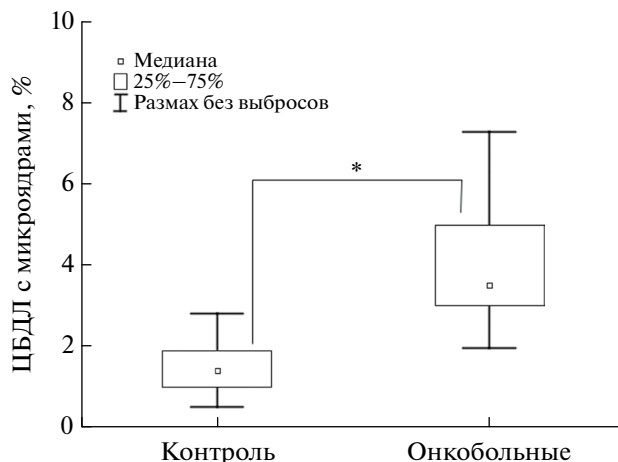


Рис. 1. Значения спонтанной частоты ЦБДЛ с МЯ у здоровых и больных индивидуумов. Данные представлены в виде медианы и межквартильного диапазона. Различия между группами статистически достоверны (* – $p \leq 0.00001$).

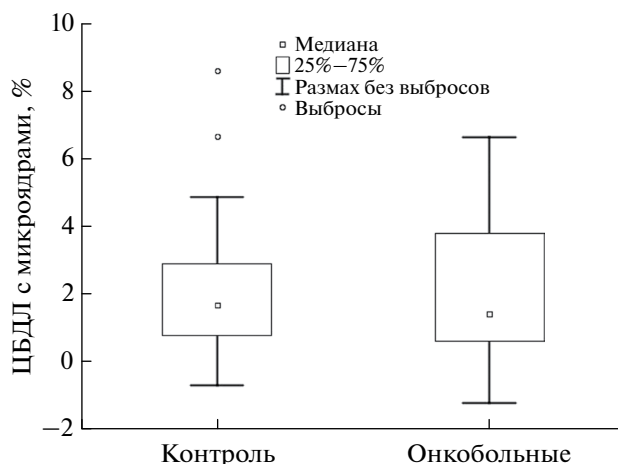


Рис. 2. Количество МЯ в ЦБДЛ здоровых и больных индивидуумов после рентгеновского облучения в дозе 10 сГр. Данные представлены в виде медианы и межквартильного диапазона.

Развитие персонализированной медицины, поиск способов преодоления негативных последствий радиотерапии, внедрение адронной терапии оставляет определение индивидуальной радиочувствительности пациентов крайне актуальным. В большинстве исследований используются дозы 1–2 Гр, которые согласно дозовым зависимостям, полученным на лимфоцитах человека с помощью цитогенетических методов, характеризуют клеточный ответ, который является результатом действия стресс-индуцированных систем репарации ДНК

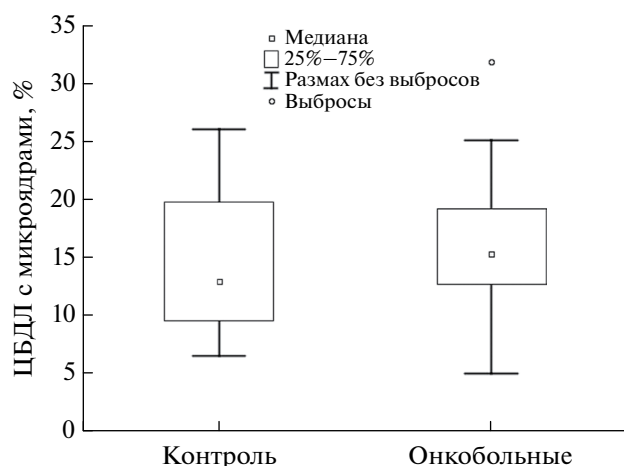


Рис. 3. Количество ЦБДЛ с МЯ у здоровых и больных индивидуумов после облучения в дозе 2 Гр. Данные представлены в виде медианы и межквартильного диапазона.

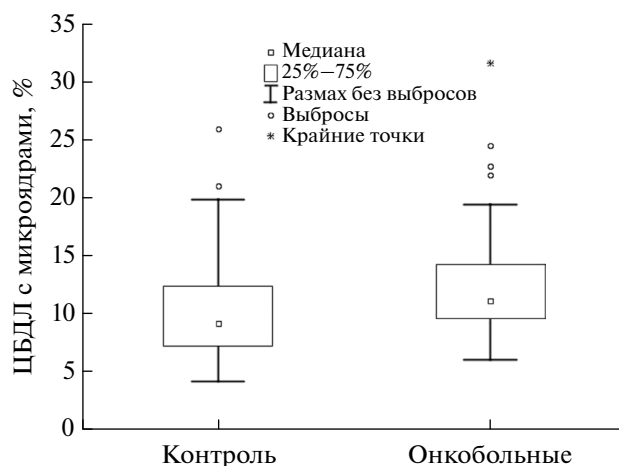


Рис. 4. Количество МЯ в ЦБДЛ здоровых и больных индивидуумов после облучения по схеме РАО (10 сГр + 2 Гр). Данные представлены в виде медианы и межквартильного диапазона.

и гибели клеток. Отсутствие разницы в радиочувствительности у исследуемых нами онкобольных свидетельствует о том, что не наблюдается нарушения репарации повреждений ДНК при облучении в дозе 2 Гр. Анализ полученных данных показал также, что нет корреляции между спонтанным уровнем МЯ в ЦБДЛ и радиочувствительностью индивидуумов в обеих группах. В работе [16] было показано, что радиочувствительность лимфоцитов человека при облучении *in vivo* и *in vitro* в дозах до 3 Гр совпадает, что позволяет рассматривать облучение цельной крови как адекватную тест-систему для определения индивидуальной радиочувствительности. Поскольку периферические лимфоциты распределены по всему телу и находятся в постоянной циркуляции, то исследуемый показатель демонстрирует степень повреждения наиболее чувствительных клеток нормальной ткани при дозе равной однократной фракции облучения при радиотерапии опухолей. Литературные данные по радиочувствительности пациентов в зависимости от вида и стадий рака противоречивы: показано снижение, повышение или отсутствие изменений относительно здоровых, и наблюдалась высокая вариабельность значений [17, 18]. Данные о корреляции спонтанного уровня цитогенетических

повреждений с радиочувствительностью лимфоцитов *in vitro* также противоречивы, что связывают с индивидуальной вариабельностью и сложностью подбора адекватных когорт для сравнения.

На рис. 4 представлены средние значения выхода МЯ в лимфоцитах здоровых и больных доноров при последовательном облучении в дозе 10 сГр, а через 5 ч (время, необходимое для развития РАО) в дозе 2 Гр. Как и при однократном облучении в малых и терапевтических дозах, в группах наблюдали значительный индивидуальный разброс: в контрольной группе значения находились в диапазоне 4.20–26.00%, а в экспериментальной – 6.10–31.70%. Вариабельность значений в обеих группах не различалась и достоверных отличий в радиочувствительности выявлено не было. Средние значения ЦБДЛ с МЯ у онкобольных и здоровых доноров были близки (12.87 и 11.37). Медианные значения в группах были 11.17 и 9.2 соответственно, которые достоверно различались от соответствующих значений при действии РИ только в дозе 2 Гр.

На основе полученных данных рассчитали величину РАО по формуле: $РАО = ((D_1 - D_0) + (D_2 - D_0)) / (D_{1+2} - D_0)$, где D_1 – количество МЯ в лимфоцитах при облучении в дозе 10 сГр; D_2 – количество МЯ в лимфоцитах при облучении в дозе 2 Гр;

Таблица 1. Частота радиационных ответов в лимфоцитах человека, облученных по схеме РАО (10 сГр+2 Гр)

Группа	N	Адаптивный ответ, %		Повышение радиочувствительности, %	
		Достоверный	Недостоверный	Недостоверное	Достоверное
Здоровые	21	62	24	14	0
Больные	31	65	29	0	6

D_0 – количество МЯ в необлученных лимфоцитах; D_{1+2} – количество МЯ в лимфоцитах при облучении в дозе 10 сГр + 2 Гр.

Анализировали четыре вида клеточного ответа: достоверный РАО при значении >1.2 , поскольку этот уровень соответствует величинам фактора уменьшения дозы наиболее эффективных химических радиопротекторов [19]; недостоверный РАО (значения 1.0–1.2), повышение радиочувствительности недостоверное (0.8–1.0) и достоверное (<0.8) [6].

Как видно из табл. 1, в обеих группах у индивидуумов наблюдалась одинаковая частота индукции РАО, максимальное значение которого в контрольной группе равнялось 3.51, а у онкобольных – 2.56. Средняя величина РАО была также одинакова в обеих когортах и равнялась 1.60 у здоровых и 1.49 у больных. Ранее похожие результаты были показаны при сравнении здоровых доноров и пациентов с иммунодефицитными состояниями [15], а также у жителей загрязненных территорий, сотрудников атомной промышленности [20, 5, 21]. Величина РАО зависит от наследственных факторов, условий индукции РАО и внешней среды. Разница между группами нами была выявлена только по количеству индивидуумов с повышенной радиочувствительностью: они наблюдались только среди больных. Мы предполагаем, что выявленная разнонаправленная реакция клеток при облучении по схеме РАО может свидетельствовать также об индукции генетической нестабильности, которая выявляется только при дополнительном облучении лимфоцитов в стрессовой нелетальной дозе или по схеме РАО.

Полученные в нашей работе результаты показали, что спонтанный уровень цитогенетических повреждений в лимфоцитах онкобольных в 2.6 раза выше, чем у здоровых индивидуумов того же возраста. Не было выявлено различий в радиочувствительности к низким и средним дозам РИ между группами, а РАО индуцировался с той же частотой в лимфоцитах больных и в той же степени, как и у здоровых доноров. Эти данные могут свидетельствовать о том, что процессы, обуславливающие возникновение и развитие различных видов рака, а также последующее лечение, не затрагивают механизмы, участвующие в формировании РАО, в частности, связанные с индукцией безошибочной репарации повреждений ДНК, которая индуцируется в узком диапазоне низких доз радиации, специфическом для каждого биологического объекта, а также регуляцией апоптоза, который приводит к гибели наиболее поврежденных клеток при облучении более высокими дозами. Использование в нашей работе показателей, которые характеризуют индивидуальную генетическую нестабильность лимфоцитов человека в условиях окислительного уровня стресса разного уровня,

на наш взгляд, является полезным для понимания роли адаптационного потенциала стволовых клеток больных в отдаленные сроки после терапии и поисков новых путей защиты здоровых тканей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность врачам ГБУЗ МО «Протвинская городская больница» за подбор когорт и взятие образцов, а также жителей г. Протвино и сотрудников ИТЭБ РАН и ФТЦ ФИАН РАН, которые участвовали в исследовании в качестве доноров.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа по исследованию радиочувствительности и индукции радиационного адаптивного ответа в лимфоцитах периферической крови пациентов с онкологическими заболеваниями выполнена в рамках фундаментальных научных исследований по темам, которые соответствуют Государственному заданию № 075-01025-23-01 (ИТЭБ РАН), а также при частичном финансировании из средств договора НИР № 04/23 между ФТЦ ФИАН и ИТЭБ РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Исследование проводили в соответствии с соответствующими национальными и международными руководящими принципами медицинской этики, изложенными в «Этических принципах медицинских исследований с участием человека Всемирной Медицинской Ассоциации» (Хельсинкская декларация 2013), и протокол экспериментов был одобрен Комиссией по биоэтике и биобезопасности ИТЭБ РАН (№ 11/23 от 8 февраля 2023 г.).

Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере и целях предстоящего исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пелевина И.И., Петушкова В.В., Бирюков В.А., и др. Роль “немишеннных эффектов” в реакции

- клеток человека на радиационное воздействие. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т. 59. №3. С. 261–273.
2. Козарко И.Н., Аклеев А.В., Петушкова В.В., и др. Адаптивный ответ как критерий оценки индивидуальной радиочувствительности человека. Обзор. // Радиация и риск. 2022. Т. 31. №1. С. 93–104.
 3. Rödel F., Frey B., Gaipf U., et al. Modulation of inflammatory immune reactions by low-dose ionizing radiation: molecular mechanisms and clinical application. // Curr Med Chem. 2012. V. 19. №12. P. 1741–1750.
 4. Balakin V.E., Zaichkina S.I., Rozanova O.M., et al., Low-dose ionizing radiation inhibits the aging-related rise in accumulation of spontaneous cytogenetic abnormalities: the genome-stabilizing effect. // Dokl Biol Sci. 2000. V. 374. P. 488–490.
 5. Ghiassi-Nejad M., Mortazavi S.M., Cameron J.R., et al. Very high background radiation areas of Ramsar, Iran: preliminary biological studies. // Health physics. 2002. V. 82. №1. P. 87–93.
 6. Петушкова В.В., Пелевина И.И., Серебряный А.М., и др. Некоторые подходы к анализу структуры адаптивного ответа при профессиональном облучении. // Радиация и риск. 2020. Т. 29. № 4. С. 97–105.
 7. Fenech M., Chang W.P., Kirsch-Volders M., et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. // Mutat Res. 2003. V. 534. №1–2. P. 65–75.
 8. World Medical Association. “World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects”. // JAMA. 2013. V. 310 №20. P. 2191–2194.
 9. Zaichkina S.I., Rozanova O.M., Aptikaeva G.F., et al. Low doses of gamma-radiation induce nonlinear dose responses in Mammalian and plant cells. // Nonlinearity Biol Toxicol Med. 2004. V. 2. №3. P. 213–221.
 10. Zaichkina S.I., Aptikaeva G.F., Rozanova O.M., et al. Action of chronic irradiation on the cytogenetic damage of human lymphocyte culture. // Environ Health Perspect. 1997. V.105. P. 1441–1443.
 11. Fenech M. The *in vitro* micronucleus technique. // Mutat Res. 2000. V. 455. №1–2. P. 81–95.
 12. Andreassi M.G., Barale R., Iozzo P., et al. The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease. // Mutagenesis. 2011. V. 26. №1. P. 77–83.
 13. Bonassi S., Znaor A., Ceppi M., et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. // Carcinogenesis. 2007. V. 28. №3. P. 625–631.
 14. Bonassi S., El-Zein R., Bolognesi C., et al. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. // Mutagenesis. 2011. V. 26. №1. P. 93–100.
 15. Rozanova O.M., Smirnova E.N., Belyakova T.A., et al. A Study on the Radiosensitivity and Induction of Adaptive Response in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Secondary Immunodeficiency Syndrome. // Biophysics. 2023. V. 68. №5. P. 767–773.
 16. Gantenberg H.W., Wuttke K., Streffer C., et al. Micronuclei in human lymphocytes irradiated *in vitro* or *in vivo*. // Radiat Res. 1991. V. 128. №3. P. 276–281.
 17. Пелевина И.И., Алещенко А.А., Антошина М.М., и др. Индивидуальная вариабельность в проявлении адаптивного ответа клеток человека на воздействие ионизирующей радиации. Подходы к ее определению. // Радиационная биология, Радиоэкология. 2007. Т. 47. №6. С. 658–666.
 18. Ivanova T.I., Khorokhorina V.A., Sychenkova N.I., et al. Proceedings of 3rd Russian Conference with International Participation “Radiobiological Foundations of Radiation Therapy”. 2019. P. 66–68.
 19. Cortese F., Klovov D., Osipov A., et al. Vive la radioresistance!: converging research in radiobiology and biogerontology to enhance human radioresistance for deep space exploration and colonization. // Oncotarget. 2018. V. 9. №18. P. 14692–14722.
 20. Barquinero J.F., Barrios L., Caballín M.R., et al. Occupational exposure to radiation induces an adaptive response in human lymphocytes. // Int J Radiat Biol. 1995. V. 67. №2. P. 187–191.
 21. Gerić M., Popić J., Gajski G., et al. Cytogenetic status of interventional radiology unit workers occupationally exposed to low-dose ionising radiation: A pilot study. // Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2019. V. 843. P. 46–51.

STUDY USING THE MICRONUCLEAR TEST OF RADIOSENSITIVITY AND INDUCTION RADIATION OF ADAPTIVE RESPONSE IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH ONCOLOGICAL DISEASES

**Corresponding Member of the RAS V. E. Balakin¹, O. M. Rozanova²,
N. S. Strelnikova^{1, #}, E. N. Smirnova², T. A. Belyakova^{2, 3}**

¹*Physical-Technical Center of Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences, Protvino, Russian Federation*

²*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation*

³*Institute for High Energy Physics named by A.A. Logunov of National Research Centre "Kurchatov Institute",
Protvino, Russian Federation*

[#]*e-mail: strelnikova.ns@lebedev.ru*

Radiosensitivity to low and medium doses of X-ray radiation (XR) and the ability to induce a radiation adaptive response (RAR) of lymphocytes during *in vitro* irradiation of peripheral blood of patients with cancer were studied. The criterion for cytogenetic damage was the frequency of micronuclei (MN) in cytochalasin-blocked binucleate lymphocytes in culture. It was found that the spontaneous level of cytogenetic damage in the lymphocytes of patients was 2.6 times higher than in healthy volunteers, and there was also significant interindividual variability in values compared to the control cohort. There were no differences in mean values for radiosensitivity to low and medium doses of XR between the study groups. There was no correlation between the spontaneous level of MN in lymphocytes and the radiosensitivity of individuals in both groups. RAR was induced with the same frequency and to the same extent in lymphocytes from both patients and healthy individuals.

Keywords: radiosensitivity, adaptive response, human lymphocytes, cancer, micronuclei, ionizing radiation

УДК 61521015+575:599323591

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ МОДУЛЯЦИЯ РЕШЕНИЯ КОГНИТИВНОГО ТЕСТА У МЫШЕЙ РАЗНЫХ ГЕНОТИПОВ

© 2024 г. О. В. Перепелкина, И. И. Полетаева

Представлено академиком РАН К.В. Анохиным

E-mail: ingapoletaeva@mail.ru

Поступило 10.05.2024 г.

После доработки 20.06.2024 г.

Принято к публикации 25.06.2024 г.

Продemonстрирована дифференциальная реакция на введение фармакологических препаратов у мышей двух линий селектированных на успешное решение теста на “неисчезаемость” и на не-решение этого теста. Реакция мышей двух линий на введение атомоксетина, блокатора обратного захвата норадреналина, и “не-бензодиазепинового” анксиолитика афобазола, была противоположной с повышением успешности решения теста у мышей, селектированных на не-решение теста и ослаблением решений или отсутствием эффекта у мышей, селектированных на решение когнитивного теста на “неисчезаемость”.

Ключевые слова: когнитивный тест, правило “неисчезаемости”, атомоксетин, афобазол, мыши, селекция

DOI: 10.31857/S2686738924050169

Исследование когнитивных способностей животных включает в себя не только достаточно разнообразные по своей “структуре” поведенческие тесты, но и различные фармакологические и генетические подходы. В настоящем сообщении представлены данные о дифференциальном влиянии двух психофармакологических агентов — атомоксетина и афобазола, на решение когнитивного теста мышами двух линий. Эти линии были селектированы, соответственно, на успешное решение теста на “неисчезаемость” и на не-решение этого теста (линии “плюс” и “минус”, далее “+” и “–”) [1]. Тест на неисчезаемость представляет собой модифицированный (укороченный по числу предъявлений) тест на поиск входа в укрытие (puzzle-box в англоязычной литературе) [2], когда помещенное в ярко освещенную часть экспериментальной камеры животное стремится уйти в темную ее часть через углубленный в пол лаз. Этот лаз может быть либо открыт (одно предъявление), либо замаскирован сначала стружкой (одно предъявление), а затем легкой “пробкой” (два предъявления), которую мышь может вытащить из лаза [1]. Статистически значимые различия в скорости (латентный период, ЛП) и в успешности решения этого теста (доли

животных в %) на протяжении нескольких первых поколений селекции [1] позволяет начать анализ возможных нервных механизмов этих различий. Причинами указанных различий могут быть разный уровень проявлений тревожности у животных этих линий, разный уровень общей активации ЦНС, а также особенности влияния данного типа селекции *per se* (контрастное проявление этого признака) на функцию некоторых структур ЦНС, связанных с выполнением собственно “когнитивного” признака. С целью анализа возможных причин межлинейных различий путем фармакологического подхода были протестированы эффекты двух разных по своим фармакологическим эффектам препаратов — афобазола, (активирует сигма-1 и сигма-2 рецепторы в разных структурах мозга и обнаруживает свойства анксиолитика [3, 4]) и атомоксетина (блокатора обратного захвата норадреналина, НА). Его введение сопровождается повышением уровня НА в «основном» ядре норадренергических нейронов — locus coeruleus и области A2 ствола мозга, а также влияет и на другие нейрхимические системы [5,6]. Ранее на линиях мышей, различающихся по весу мозга, мы показали, что введение атомоксетина вызвало генотип-зависимые изменения в выполнении теста на “неисчезаемость” [7]. В настоящем сообщении приводятся данные по скорости и успешности выполнения

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

данного теста мышами линий “+” и “—” при действии данных препаратов.

Эффекты афобазола. Афобазол (в питьевой воде, из расчета 30 мг/кг в сутки в течение 7 дней) получали 16 мышей линии “+” и 12 мышей линии “—”. Контрольные мыши (24 и 25 мышей, соответственно) пили воду. Мыши обеих линий, получавшие афобазол, выполняли тест (переход в темное отделение камеры) достоверно быстрее во всех 4 предъявлениях теста. Например, при открытом лазе (1-е предъявление теста) для мышей линии “+” это было $71,7 \pm 11,7$ с vs $131,6 \pm 13,6$ с, $p < 0,05$, а для линии “—” — $38,2 \pm 9,6$ с vs $73,9 \pm 9,4$ с, $p < 0,05$. Решение данного теста в предъявлениях, когда переход в темное отделение был закрыт пробкой более четко характеризуют не ЛП, а доля животных, которые за 240 с, условно отведенные для решения этого этапа теста, смогли вынуть или отодвинуть пробку и перейти в темноту. Эти данные представлены на рис. 1 А. Гистограммы показывают, что у мышей линии “—” выполнение этого этапа теста было достоверно более успешным после действия афобазола, по сравнению с контролем, тогда как у мышей линии “+” значимых различий между двумя группами не было. Более быстрое выполнение теста при действии афобазола можно было бы предположительно объяснить анксиолитическим эффектом этого соединения, однако ускоренная реакция ухода из анксиогенной обстановки (освещенной части камеры) также была более быстрой после афобазола, что не полностью отвечает картине снижения тревожности. Если под действием афобазола мыши линии “—” испытывали меньшую тревожность, они могли бы дольше оставаться в освещенной части камеры и исследовать ее. Иными словами, объяснения этого эффекта только анксиолитическими свойствами афобазола не достаточно.

Эффекты атомоксетина. Атомоксетин в дозе 2 мг/кг в. б. вводили мышам двух линий в течение 7 дней (10 мышей линии “+”, 9 мышей линии “—”), контрольным мышам вводили физиол. р-р (10 мышей линии “+”, 7 мышей линии “—”). Результаты теста также выявили дифференциальный характер эффекта данного соединения. В целом, ЛП перехода в темноту у мышей линии “+” был длиннее, чем у мышей линии “—”. Так, например, в предъявлении теста с открытым лазом у мышей “+” этот ЛП после атомоксетина был равен $63,5 \pm 13,2$ с vs $23,1 \pm 13,2$ с в контроле, $p < 0,05$, тогда как у мышей “—” после атомоксетина он был $54,4 \pm 13,9$ с vs $93,0 \pm 15,7$ с в контроле, тенденция $p = 0,07$. Влияние атомоксетина на успешность решения теста также было противоположным по “знаку” (см. рис. 1Б). Гистограммы показывают, что эффект атомоксетина, “повышающий” успешность решения наиболее трудного этапа теста, когда лаз заблокирован “пробкой” у мышей “—”, был более четким, чем ухудшение успешности решения после атомоксетина у мышей линии “+”. Оценка успешности решения предъявления теста с лазом, закрытым пробкой, с помощью двухфакторного ANOVA выявила достоверное влияние фактора “линия” (мыши “+” vs “—” ($F_{1-2} = 15,5152$, $p = 0,0004$) и достоверный эффект взаимодействия факторов “линия” и “воздействие” ($F_{1-2} = 8,28552$, $p = 0,0007$). Это свидетельствует о дифференциальном влиянии атомоксетина на решение трудного этапа теста мышами разных генотипов. Представленные в настоящем сообщении данные позволяют предположить, что для выполнения “трудного” этапа теста с лазом, закрытым пробкой, существует определенный “оптимальный” уровень норадренергической иннервации переднего мозга (которая

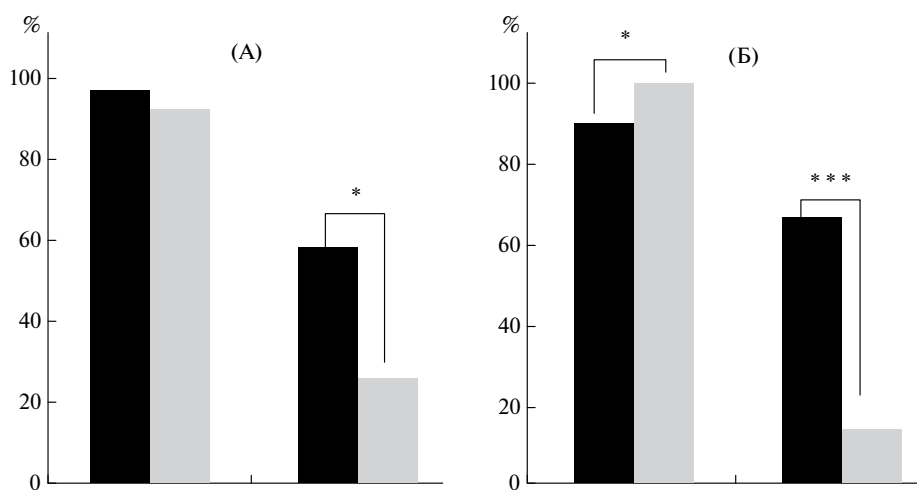


Рис. 1. Доли (% , ось ординат) успешных решений теста на поиск входа в укрытие в предъявлениях теста с лазом, замаскированным пробкой (суммарно для двух предъявлений этого теста). Показатели линии “+” — пара столбиков слева, линии “—” — пара столбиков справа. Черные столбики — действие афобазола (А) и атомоксетина (Б), серые — контроль. * *** — достоверные различия при $p < 0,05$ и $p < 0,001$ (φ тест Фишера, оценка разности альтернативных долей).

генотип-зависимым образом изменяется от атомоксетина), а поскольку структуры переднего мозга напрямую участвуют в реализации решения когнитивных тестов, то их функция может по-разному модулироваться у животных разных генотипов [8, 9]. Атомоксетин улучшил выполнение когнитивных тестов, в других исследованиях такой эффект напрямую связывают с его влиянием на структуры переднего мозга [8, 10]. Следует, однако, отметить, что влияние атомоксетина описывается, преимущественно, у животных с генетически измененной экспрессией определенных нейрохимических каскадов, например в [9]. В то же время нельзя забывать и о возможных межлинейных различиях в экспрессии тревожности при действии афобазола [11–13]. Представленные данные раскрывают важный аспект действия психотропных средств, что может быть информативным для применения подобных соединений в клинике [14].

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Все эксперименты проведены в соответствии с Директивой ЕС от 2010 г. (ЕС Directive 63-2010 63-2010) в рамках проекта “Физиологические и генетические основы поведения”. Рассмотрена и одобрена Комиссией по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова 18.06.2014 на заседании № 49.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Поддержано грантом РНФ № 23-25-00042.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Поletaева И.И., Перепелкина О.В., Зорина З.А. // Биофизика. 2023. Т. 68, № 5, С. 1046–1056.
2. Galsworthy M.J., Paya-Cano J. L., Liu L., et al. // Behav. Genet. 2005. V. 35, № 5. P. 675–692
3. Cuevas J., Rodriguez A., Behensky A., et al. // J Pharmacol Exp Ther 2011. V. 339. P. 161–172.
4. Уянаев А.А., Фисенко В.П. Хитров Т.К. // Бюлл. эксп. Биол. мед. 2003. Т.136. №2. 162–164.
5. Baria A., Xua S., Pignatelli M. et al. // PNAS. 2020. V. 117. №46. P. 29080–29089
6. Ptukha M., Fesenko Z., Belskaya A., et al. // Biomolecules 2022, 12, 1484.
7. Perepelkina O.V., Poletaeva I.I. // Neurol. Int. 2023. V. 15. № 2. P. 649–660;
8. Chloe S. Chernoff C.S., Hynes T.J., et al. // Psychopharmac. 2024. V. 241. P.767–783.
9. Ptukha M., Fesenko Z., Belskaya A., et al. // Biomolecules 2022, 12, 1484.
10. Cain R.E., Wasserman M.C., Waterhouse B.D., McGaughy J.A. // Dev Cogn Neurosci. 2011. V. 1. № 4. P. 552–559.
11. Salomons A. R., Arndt S.S., Ohl F. // J. Behav. Brain Sci. 2013. №3. P. 210–216
12. Калинина Т.С., Шимширт А.А., Волкова А.В., и др. // Эксп. клин. фармак. 2016. Т. 79. № 10. С. 3–7.
13. Robinson E.D.J. // Psychopharm. 2012. V. 219. P. 303–312.
14. Robbins T.W. // Br J Pharmacol. 2017. V. 174. № 19. P. 3191–3199

PHARMACOLOGICAL MODULATION OF COGNITIVE TEST SOLUTION IN MICE OF TWO GENOTYPES.

O. V. Perepelkina, I. I. Poletaeva

Presented by Academician of the RAS K.V. Anokhin
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation
e-mail: ingapoletaeva@mail.ru

Mice of two strains selected for successful solution of “object permanence” test and for lack of such solution demonstrated the differential reaction to injections of two drugs. The injections of atomoxetine, which blocks the noradrenaline reuptake, and of “non-benzodiazepine” anxiolytic afobazol was different. The success of solutions increased in mice selected for this test “non-solution”: and decreased or was inefficient in mice, selected for successful solution of object permanence cognitive test.

Keywords: cognitive test, “object permanence” rule, atomoxetine, afobazol, mice, selection

УДК 577.218

БЕЛОК XMAS-2, ОСНОВНОЙ БЕЛОК КОМПЛЕКСА ЭКСПОРТА мРНК TREX-2, НЕ ОПРЕДЕЛЯЕТ СПЕЦИФИЧНОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ мРНК *Ras2* КОМПЛЕКСОМ

© 2024 г. М. М. Куршакова, Ю. А. Вдовина, академик РАН С. Г. Георгиева, Д. В. Копытова*

Поступило 04.06.2024 г.

После доработки 20.06.2024г.

Принято к публикации 20.06.2024 г.

Комплекс TREX-2 эукариот отвечает за экспорт из ядра в цитоплазму широкого спектра мРНК. Ранее мы показали, что субъединица комплекса TREX-2 *D. melanogaster*, белок PCID2, имеет домен, специфично взаимодействующий с РНК. Однако, остается неизвестным, участвуют ли другие компоненты комплекса во взаимодействии с целевой мРНК и в ее узнавании. В настоящей работе мы определяли роль Xmas-2, основной структурной субъединицы комплекса, в специфичном распознавании фрагментов мРНК *ras2*. В данной работе мы показали, что Xmas-2 взаимодействует с мРНК *ras2* независимо от других субъединиц комплекса. Мы показали, что РНК-связывающие домены располагаются как в N-концевом домене, так и С-концевом домене Xmas-2. Однако, взаимодействие белка с фрагментами мРНК *ras2* не зависит от последовательности и структуры РНК и является неспецифичным. Таким образом, субъединица Xmas-2 не участвует в распознавании комплексом определенных последовательностей РНК.

Ключевые слова: TREX-2, Xmas-2, экспорт мРНК, транскрипция, EMSA

DOI: 10.31857/S2686738924050174

Эволюционно-консервативный комплекс эукариот TREX-2 отвечает за экспорт мРНК из ядра в цитоплазму [1–5]. У *D. melanogaster* в его состав входят белки Xmas-2, PCID2, ENY2 и Sem1p [6]. В составе комплекса Xmas-2 представляет собой структурную субъединицу, с которой взаимодействуют другие субъединицы комплекса [7, 8–11]. Комплекс отвечает за ядерный экспорт широкого спектра молекул мРНК. Однако, существуют данные, что экспорт не всех мРНК зависит от TREX-2 [12]. В связи с этим встает вопрос, как комплекс узнает свои целевые мРНК и какие белки комплекса отвечают за взаимодействие с определенной мРНК. Недавно мы показали, что у *D. melanogaster* субъединица PCID2 связывает РНК гена *ras64B* (*ras2*) с помощью двух доменов, один из которых специфично связывается с 3'-некодирующей областью мРНК *ras2* [13]. Другой домен PCID2 взаимодействует с мРНК неспецифично, но для его связывания необходим

домен специфичного взаимодействия. Таким образом, первоначальное узнавание последовательности мРНК происходит за счет специфического домена, после чего происходит специфичное взаимодействие PCID2 с мРНК [13].

В данной работе мы исследовали, участвует ли основная структурная субъединица Xmas-2 в специфичном взаимодействии с мРНК *ras2*. На первом этапе было изучено, связывается ли Xmas-2 с какими-то определенными участками целевой мРНК. Для эксперимента по связыванию был взят полноразмерный Xmas-2 и мРНК гена *ras2*, поскольку ранее методом иммунопреципитации РНК было показано взаимодействие Xmas-2 с данной мРНК [6]. Схема деления РНК на фрагменты представлена на Рисунке 1а.

РНК была поделена на четыре фрагмента: 1 – включал в себя 5'-некодирующую область *ras2*, 2 и 3 – последовательные фрагменты кодирующей области, 4 – 3'-некодирующую область *ras2*. Для экспериментов EMSA фрагменты РНК были радиоактивно мечены [32P]УТР. В реакцию связывания с РНК добавляли экспрессированный в бактериальной системе и очищенный полноразмерный Xmas-2, слитый с GST-эпитопом. По результатам эксперимента оказалось, что GST-Xmas-2

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук

*e-mail: d_dmitrieva@mail.ru

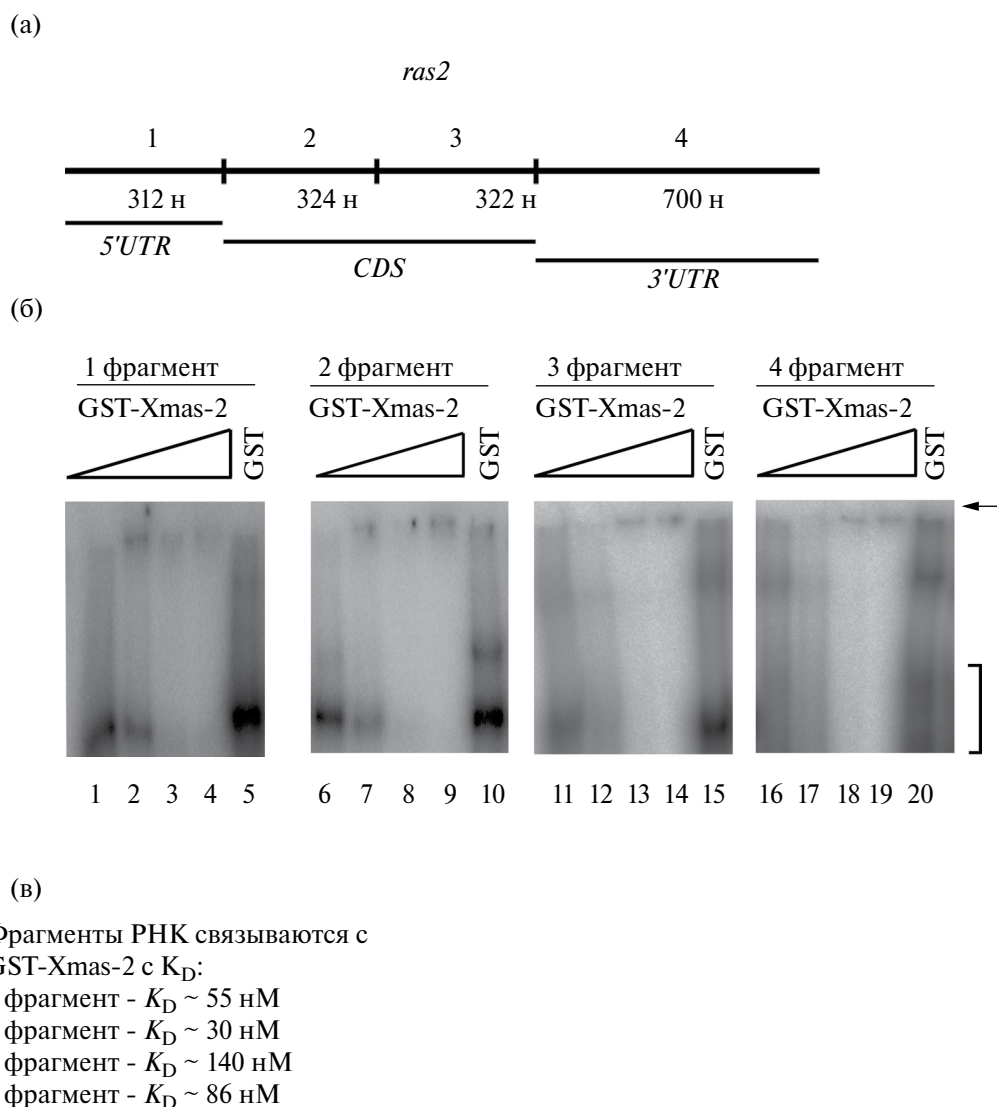


Рис. 1. Анализ взаимодействия полноразмерного Xmas-2 с фрагментами РНК *ras2* гена *D. melanogaster*. (а) Схема деления *ras2* на фрагменты, взятые в эксперимент по связыванию. (б) На рисунке представлены автографы 5% ПААГ. Скобочкой отмечена миграция свободной РНК, а стрелочкой образующиеся комплексы белок-РНК. Концентрация каждого меченого фрагмента РНК в реакции связывания составляла 25 нМ. Представлены результаты взаимодействия GST-Xmas-2: на дорожках 1–5 – с фрагментом 1 *ras2*; 6–10 – с фрагментом 2 *ras2*; 11–15 – с фрагментом 3 *ras2*; 16–20 – с фрагментом 4 *ras2*. На первой дорожке каждой реплики белок отсутствовал (полосы 1, 6, 11, 16), на каждой копии концентрация GST-Xmas-2 составляла 12,5 нМ – на второй дорожке, 25 нМ – на третьей дорожке, 50 нМ – на четвертой дорожке. На пятой дорожке каждой копии представлен результат связывания 7 нМ GST с РНК. (в) На рисунке представлены K_D , посчитанные по результатам, представленным на рис. 1б.

связывает каждый из протестированных фрагментов РНК *ras2* (Рис. 1б, в).

Таким образом, Xmas-2 может взаимодействовать с мРНК независимо от других белков комплекса TREX-2. При этом Xmas-2 связывает фрагменты РНК *ras2* независимо от их последовательности, то есть его взаимодействие с РНК является неспецифичным.

Ранее нами было показано, что в клетке Xmas-2 специфически расщепляется на два белка,

соответствующих его N- и C-концевым последовательностям (N-концевой Xmas-2 около 80 кДа, C-концевой около 100 кДа) [14]. N-концевой фрагмент включает в себя SAC3-GANP домен, отвечающий за взаимодействие с PCID2 и РНК, а C-концевой фрагмент содержит домен CID, отвечающий за взаимодействие с ENY2 и ядерной порой. Можно предположить, что за взаимодействие с РНК отвечают домены, расположенные только в одном из фрагментов Xmas-2,

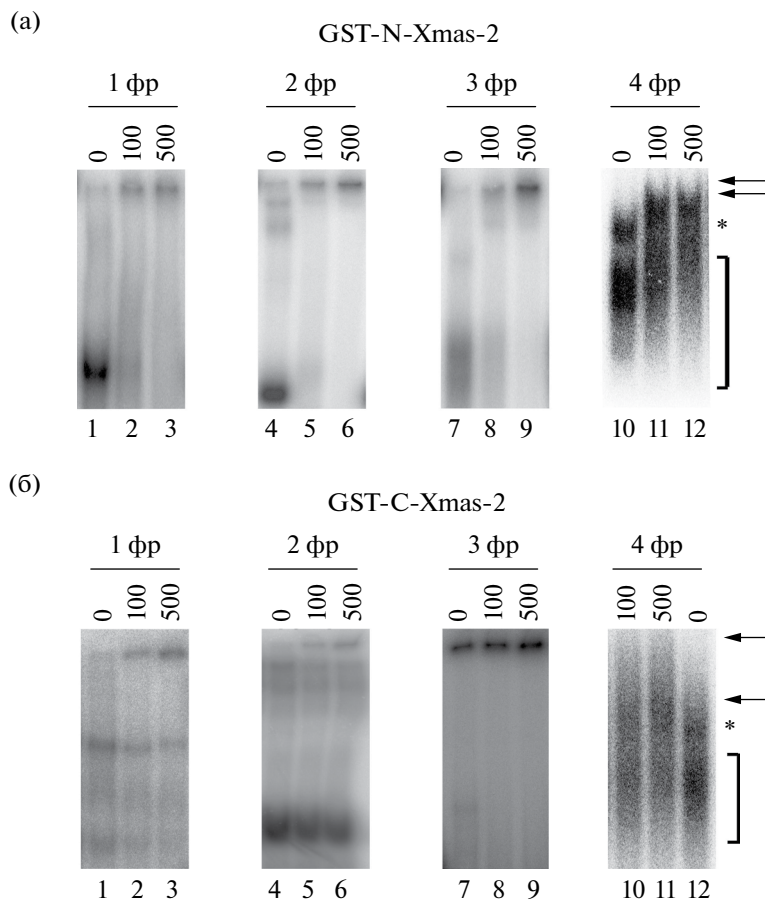


Рис. 2. Анализ взаимодействия С-Хмас-2 и N-Хмас-2 с фрагментами мРНК *ras2*. (а, б) Комплексы, образующиеся при связывании N-Хмас-2 и С-Хмас-2 с фрагментами *ras2* РНК анализировали на 5% ПААГ. На рисунке представлены автографы. Скобочкой и, в случае белка GST, звездочкой, отмечена миграция свободной РНК, а стрелочкой отмечены образующиеся комплексы белок-РНК. Концентрация меченых $[^{32}\text{P}]\text{UTP}$ фрагментов мРНК *ras2* в реакции связывания составляла 25 нМ. (а) РНК инкубировали с увеличивающимися количествами очищенного GST-N-Хмас-2: дорожки 1, 4, 7, 10 – белок в реакцию не добавлялся; 2, 5, 8, 11 – 5 нМ белка было добавлено в реакцию связывания; 3, 6, 9, 12 – 50 нМ белка было добавлено в реакцию связывания. (б) РНК инкубировали с увеличивающимися количествами очищенного GST-C-Хмас-2: дорожки 1, 4, 7, 12 – белок в реакцию не добавлялся; 2, 5, 8, 10 – 5 нМ белка было добавлено в реакцию связывания; 3, 6, 9, 11 – 50 нМ белка было добавлено в реакцию связывания.

или N- и С-концевой домены взаимодействуют с РНК с различной эффективностью. Для проверки данного предположения были созданы конструкции, содержащие кодирующие последовательности N-концевой части Xmas-2 (1-594 ак) и С-концевой части Xmas-2 (595-1370 ак), слитые с GST-эпитопом. Сверхэкспрессированные в бактериальной системе очищенные белки связывали с радиоактивно мечеными фрагментами РНК *ras2*, использованными ранее в экспериментах по связыванию полноразмерного Xmas-2 (Рис. 1а). В реакциях EMSA как N-Хмас-2 (Рис. 2а), так и С-Хмас-2 (Рис. 2б), слитые с GST-эпитопом, связывали каждый из фрагментов *ras2* РНК, взятый в эксперимент.

Таким образом, Xmas-2 имеет домены взаимодействия с РНК как в N-концевой, так и в С-концевой

части. Оба домена белка могут связывать фрагменты РНК *ras2* независимо друг от друга.

Для проверки того, взаимодействуют ли N-концевая и С-концевая части Xmas-2 с мРНК *in vivo* были проведены эксперименты по иммунопреципитации мРНК *ras2* из S2 клеток *D. melanogaster*. В S2 клетках были сверхэкспрессированы N-Хмас-2 и С-Хмас-2, слитые с тремя FLAG-эпитопами (Рис. 3а).

Из ядерного экстракта S2 клеток была проведена иммунопреципитация РНК, с использованием антител к FLAG-эпитопу. Как N-Хмас-2, так и С-Хмас-2 эффективно осаждали РНК *ras2* из лизата клеток (Рис. 3б). Таким образом, оба фрагмента Xmas-2, сверхэкспрессированные в S2 клетках *D. melanogaster*, взаимодействуют

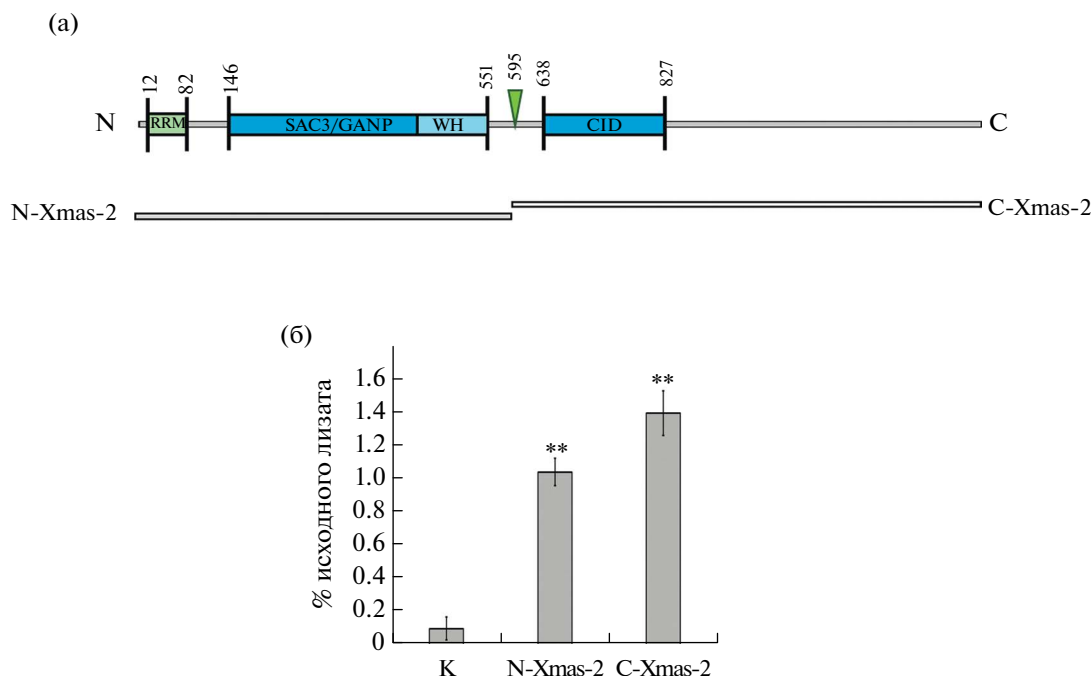


Рис. 3. N-Xmas-2 и C-Xmas-2 осаждают мРНК *ras2* из ядерного экстракта S2 клеток. (а) Схема доменной организации белка Xmas-2. На схеме отмечены моделирующие расщепление Xmas-2 сверхэкспрессированные с FLAG-эпитопами белки, содержащие N- и C-концевые фрагменты Xmas-2. (б) Реакции иммунопреципитации мРНК (RIP) *ras2* были проведены с использованием антител к FLAG-эпиту из ядерных экстрактов S2 клеток с сверхэкспрессированными белками FLAG-N-Xmas-2 и FLAG-C-Xmas-2. В качестве контроля был использован неиммунный IgG.

с РНК, что подтверждает данные, полученные в EMSA.

Таким образом, мы показали, что белок Xmas-2 имеет несколько доменов связывания мРНК *ras2*, расположенных в N- и C-концевых частях белка. Присутствие домена взаимодействия с РНК в N-концевой части Xmas-2 было также показано для дрожжей [9]. В данной работе впервые показано, что у высших эукариот существуют два участка взаимодействия. Мы также показали, что взаимодействие Xmas-2 с РНК *in vitro* неспецифично. Вероятно, за специфичность взаимодействия комплекса TREX-2 с РНК отвечают другие белки комплекса. Одним из них, как было показано нами ранее, является PCID2 [13].

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП ИМБ РАН.

ИНФОРМАЦИЯ О КОНФЛИКТЕ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Данная статья не содержит исследований с участием животных или людей, проведенных кем-либо из авторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fischer T. 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. Vol. 21, № 21. P. 5843–5852.
2. Kurshakova M.M. et al. SAGA and a novel Drosophila export complex anchor efficient transcription and mRNA export to NPC // EMBO Journal. 2007. Vol. 26, № 24.
3. Lu Q. 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. Vol. 61, № 2. P. 259–270.

4. Luna R., Gonzalez-Aguilera C., Aguilera A. Transcription at the proximity of the nuclear pore: a role for the THP1-SAC3-SUS1-CDC31 (THSC) complex. // RNA biology. United States, 2009. Vol. 6, № 2. P. 145–148.
5. Wickramasinghe V.O. et al. mRNA export from mammalian cell nuclei is dependent on GANP. // Current biology : CB. England, 2010. Vol. 20, № 1. P. 25–31.
6. Kopytova D. 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.
7. Gordon J.M.B., Aibara S., Stewart M. Structure of the Sac3 RNA-binding M-region in the Saccharomyces cerevisiae TREX-2 complex. // Nucleic acids research. 2017. Vol. 45, № 9. P. 5577–5585.
8. Aibara S., Bai X.-C., Stewart M. The Sac3 TPR-like region in the Saccharomyces cerevisiae TREX-2 complex is more extensive but independent of the CID region. // Journal of structural biology. 2016. Vol. 195, № 3. P. 316–324.
9. Ellisdon A.M. 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. Vol. 19, № 3. P. 328–336.
10. Jani D. 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. Vol. 33, № 6. P. 727–737.
11. Stewart M. Structure and Function of the TREX-2 Complex. // Sub-cellular biochemistry. United States, 2019. Vol. 93. P. 461–470.
12. Wickramasinghe V.O. et al. Selective nuclear export of specific classes of mRNA from mammalian nuclei is promoted by GANP. // Nucleic acids research. England, 2014. Vol. 42, № 8. P. 5059–5071.
13. Vdovina Y.A. et al. PCID2 Subunit of the Drosophila TREX-2 Complex Has Two RNA-Binding Regions. // Current issues in molecular biology. Switzerland, 2023. Vol. 45, № 7. P. 5662–5676.
14. Kurshakova M.M., Georgieva S.G., Kopytova D.V. The Xmas-2 Protein of Drosophila melanogaster Undergoes Cleavage into Two Fragments. // Doklady Biochemistry and biophysics. United States, 2023. Vol. 509, № 1. P. 37–40.

XMAS-2 PROTEIN, A CORE PROTEIN OF THE TREX-2 MRNA EXPORT COMPLEX, IS NOT DETERMINED THE SPECIFICITY OF RAS2 MRNA BINDING BY THE COMPLEX

M. M. Kurshakova, Y. A. Vdovina, Academician of the RAS S. G. Georgieva, D. V. Kopytova

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

*e-mail: d_dmitrieva@mail.ru

The TREX-2 complex of eukaryotes is responsible for the export of a wide range of mRNAs from the nucleus to the cytoplasm. Previously, we showed that a subunit of the *D. melanogaster* TREX-2 complex, the PCID2 protein, has a domain that specifically interacts with RNA. However, it remains unknown whether other components of the complex are involved in interaction with and recognition of the target mRNA. In the present work, we determined the role of Xmas-2, the core structural subunit of the complex, in the specific recognition of *ras2* mRNA fragments. In this work, we showed that Xmas-2, interacts with *ras2* mRNA independently of other subunits of the complex. We showed that RNA-binding domains are located in both the N-terminal domain and the C-terminal domain of Xmas-2. However, the interaction of the protein with *ras2* mRNA fragments is independent of RNA sequence and structure and is nonspecific. Thus, the Xmas-2 subunit is not involved in the recognition of specific RNA sequences by the complex.

Keywords: TREX-2, Xmas-2, mRNA export, transcription, EMSA

УДК 577.151.4

ВЫСОКООШИБОЧНЫЙ СИНТЕЗ ДНК НА КЛИК-ЛИГИРОВАННЫХ МАТРИЦАХ

© 2024 г. А. В. Ендуткин¹, А. О. Яковлев^{1, 2}, Т. Д. Жарков¹, В. М. Голышев¹, А. В. Юдкина¹,
член-корреспондент РАН Д. О. Жарков^{1, 2, *}

Поступило 10.05.2024 г.

После доработки 30.05.2024 г.

Принято к публикации 30.05.2024 г.

Клик-лигирование — метод соединения фрагментов ДНК, основанный на азид-алкиновом циклоприсоединении. В наиболее распространенном варианте клик-лигирование вводит 4-метил-1,2,3-триазольную группу (trз) вместо фосфодиэфирной связи между двумя нуклеозидами. Хотя такая связь считается биосовместимой, практически ничего не известно о возможности ее узнавания системами репарации ДНК или о потенциале блокирования и ошибок ДНК-полимераз. В работе показано, что trз-связь устойчива к нескольким эндонуклеазам, участвующим в репарации ДНК бактерий и человека. В то же время она сильно блокирует некоторые ДНК-полимеразы (Pfu, ДНК-полимераза β), но проходит другими (полимераза фага RB69, фрагмент Кленова). Все полимеразы, за исключением ДНК-полимеразы β, с высокой частотой ошибаются при прохождении trз-связи, включая dAMP вместо следующего комплементарного нуклеотида. Таким образом, от клик-лигирования можно ожидать низкой точности в технологиях генного синтеза.

Ключевые слова: клик-химия; ДНК-полимеразы; репликация ДНК; мутации; репарация ДНК; АП-эндонуклеазы.

DOI: 10.31857/S2686738924050186

Катализируемая медью(I) реакция циклоприсоединения между азидами и алкинами с образованием 1,2,3-триазолов [1, 2] оказалась настолько региоселективной и эффективной, что породила целую область “клик-химии”. В настоящее время клик-реакции успешно используются в том числе для высокоэффективной постсинтетической функционализации модифицированных алкиновыми группами оснований ДНК или ненуклеотидных линкеров [3, 4]. Большой интерес в качестве инструмента молекулярной биологии представляет клик-лигирование — соединение фрагментов ДНК с образованием межнуклеозидной триазольной (trз-) связи (рис. 1а) [5, 6]. Несмотря на то, что по своей химической природе она радикально отличается от канонической фосфодиэфирной межнуклеозидной связи, структурные исследования показывают, что конформация ДНК, содержащей одну trз-связь, практически идентична конформации стандартной В-ДНК (рис. 1б) [7].

Клик-лигирование может применяться для сборки из олигонуклеотидов протяженных фрагментов ДНК, ДНК- и РНК-конструкций сложной пространственной структуры и т. п. [5, 8].

Для применения реакций клик-лигирования в молекулярно-биологических технологиях критически важно понимание принципов взаимодействия белков, действующих на нуклеиновые кислоты, с ДНК, содержащей trз-связи. Сообщалось о том, что некоторые ДНК-полимеразы — Taq, Pfu, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *Escherichia coli* (KF) — способны вести синтез при наличии trз-связи в ДНК-матрице, при этом секвенирование полученных таким образом ПЦР-ампликонов не выявляет нуклеотидных замен [5]. Активность РНК-полимеразы бактериофага T7 подавляется присутствием trз-связи в промоторе, но не в матрице при элонгации [9]. Отсутствие мутаций и нормальная транскрипция наблюдаются и при трансфекции *E. coli* плазмидой, содержащей единичную trз-связь [5, 6]. Однако такие результаты плохо согласуются с известными структурами ДНК- и РНК-полимераз, в активном центре которых матричная цепь обычно сильно изломана, что может быть затруднительно для нестандартной trз-связи [10]. Дополнительные проблемы могут возникать при

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*e-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru

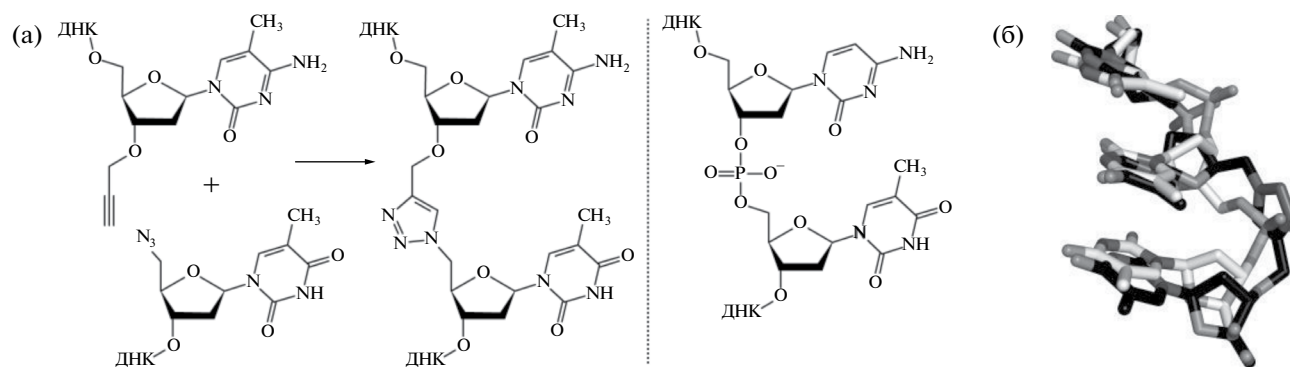


Рис. 1. а – схема получения олигонуклеотида с триазольной межнуклеозидной связью и ее структура в сравнении с природной фосфодиэфирной связью. б – конформация trz-связи в сравнении с фосфодиэфирной связью по данным спектроскопии ядерного магнитного резонанса [7]. Приведено строение части немодифицированного ДНК-дуплекса (код структуры в базе данных Protein Data Bank 2KUZ, атомы углерода окрашены в белый цвет) и дуплекса с trz-связью (код 2L8I, атомы углерода окрашены в черный цвет).

попадании ДНК с trz-связями в клетку, поскольку модификация клеточного генома находится под плотным контролем со стороны систем репарации и ответа на повреждения ДНК. Любой неканонический нуклеотид в составе ДНК воспринимается как повреждение и удаляется. Таким образом, активность ДНК-полимераз и ферментов репарации в отношении ДНК с синтетической trz-связью нуждается в изучении.

В работе была исследована способность эндонуклеаз репарации ДНК – APE1 человека, Xth и Nfo *E. coli* – расщеплять ДНК в области trz-связи и способность ДНК-полимераз разных структурных семейств – KF, ДНК-полимеразы бактериофага RB69 (RBpol), Pfu и ДНК-полимеразы β человека (Pol β) – проходить trz-связь при синтезе ДНК. Выделение всех использованных в работе белков и источники коммерчески доступных ферментов описаны ранее [11]. В случае KF и RBpol в последовательность белка были внесены аминокислотные замены (D355A/E357A и D222A/D327A соответственно) для подавления 3'→5'-экзонуклеазной активности, которая зачастую гидролизует праймеры при невозможности их удлинения. Для получения олигонуклеотида с 3'-концевым остатком 3'-пропаргил-5-метил-2'-дезоксирибозитидина (mod3, последовательности всех олигонуклеотидов сведены в табл. 1) использовали соответствующий твердофазный носитель (Glen Research, США). Для получения олигонуклеотида с 5'-концевым остатком 5'-азидо-2'-дезокситимидина использовали амидофосфит 5'-иодо-2'-дезокситимидина (Glen Research, США). Для конверсии в азидное производное после получения 5'-иодсодержащего олигонуклеотида (mod5) носитель обрабатывали насыщенным раствором NaN_3 в диметилфосфате в течение ночи при комнатной температуре, далее отмывали от NaN_3 и обрабатывали

концентрированным раствором аммиака при 55°C в течение ночи для отщепления олигонуклеотида. Очистку проводили обращеннофазовой хроматографией на колонке Zorbax SB-C18 (Agilent, США). Далее 3'-пропаргил- и 5'-азидсодержащие олигонуклеотиды отжигали с комплементарным немодифицированным олигонуклеотидом длиной 26 нуклеотидов (T1) в соотношении 1:1:1.2 и проводили клик-реакцию в условиях: 100 мкМ комплекс ДНК, 200 мМ триэтиламмонийацетат (pH 7.0), 50%-ный диметилсульфоксид, 0.5 мМ аскорбиновая кислота, 0.5 мМ Cu(II)-трис(бензилтриазилил)амин. Смесь барботировали аргоном и оставляли на ночь при комнатной температуре. Продукт осаждали 2%-ным LiClO_4 в ацетоне, полученный конъюгат длиной 33 нуклеотида (33trz) отделяли от непрореагировавших и комплементарных олигонуклеотидов электрофорезом в денатурирующем 20%-ном полиакриламидном геле.

По соображениям доступности мономеров для синтеза все исследуемые субстраты содержали с 5'-стороны от trz-связи 5-метил-2'-дезоксирибозитидин (mC). Этот минорный нуклеозид встречается в ДНК, где выполняет регуляторные функции и не оказывает заметного влияния на активность ферментов обмена нуклеиновых кислот. Как следствие, такие олигонуклеотиды представляются вполне подходящими для изучения действия ДНК-полимераз и нуклеаз на субстраты, содержащие trz-связь. По сравнению с дуплексом 33mC//T2, содержащим лишь фосфодиэфирные связи, дуплекс 33trz//T2 был несколько менее стабилен ($T_{\text{пл}} = 77.9^\circ\text{C}$ и 75.2°C соответственно; $T_{\text{пл}}$ измеряли на спектрофотометре Cary 300-Bio Melt по поглощению при 260 нм), однако это не должно заметно влиять на количество дуплекса при 37 °C.

Таблица 1. Последовательности олигодезоксирибонуклеотидов, использованных в работе

Код	Последовательность, 5'→3'	Модификация
mod3	CCAGTGGTAATCTAX	X = 3'-пропаргил-5-метил-dC
mod5	YGGGACGGAACAGCTTTG	Y = 5'-иодо-dT
33trz	CCAGTGGTAATCTAM[trz]TGGGACGGAACAGCTTTG	M = 5-метил-dC [trz] = триазольная межнуклеозидная связь
33mC	CCAGTGGTAATCTAMTGGGACGGAACAGCTTTG	M = 5-метил-dC
T1	CTGTTCCGTCCCAGTAGATTACCACT	
T2	CAAAGCTGTTCCGTCCCAGTAGATTACCACTGG	
P1	CAAAGCTGTTCCG	
P2	CAAAGCTGTTCCGTCCCA	
M15	CCAGTGGTAATCTAC	
M16	CCAGTGGTAATCTACT	
M33	CCAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTG	

Апурин-апирииминовые (АП-) эндонуклеазы в процессе эксцизионной репарации оснований ДНК расщепляют АП-сайты, возникающие после удаления поврежденных оснований, а также способны гидролизовать ДНК с 5'-стороны от некоторых окислительных повреждений, например, α-аномерных нуклеотидов [12]. При исследовании способности эндонуклеаз репарации расщеплять одно- и дуплетные олигонуклеотиды в районе trz-связи выяснилось, что апурин-апирииминовая эндонуклеаза человека APE1 малоактивна в отношении такой ДНК (рис. 2). Лишь при 20-кратном молярном избытке над дуплетным субстратом и длительной инкубации в присутствии Mg^{2+} появлялись продукты размером менее 15 нуклеотидов, что соответствует гидролизу связи с 5'-стороны от mC и дальнейшему проявлению экзонуклеазной активности фермента (рис. 2, дорожка 6). Эндонуклеаза IV *E. coli* (Nfo) была неспособна гидролизовать субстраты с trz-связью (данные не приведены). Экзонуклеаза III *E. coli* (Xth) — гомолог APE1 — помимо эндонуклеазной, обладает сильной 3'→5'-экзонуклеазной активностью по отношению к дуплетной ДНК. При действии Xth на дуплекс 33trz//T2 образовывался продукт, подвижность которого была заметно меньше, чем у 16-звенного олигонуклеотидного маркера M16 (рис. 2, дорожка 10). Поскольку при гидролизе 33trz с 3'-стороны от места модификации ^{32}P -меченый продукт содержит одну незаряженную trz-связь, что снижает его электрофоретическую подвижность, Xth в данном случае предположительно, проявляет именно свою экзонуклеазную активность, но останавливается за 1–2 нуклеотида до trz-связи. С этим объяснением также согласуется и то, что при замене Mg^{2+}

на Ca^{2+} , что снижает экзонуклеазную активность Xth гораздо больше, чем эндонуклеазную, образовывалась смесь еще более длинных продуктов. Активность APE1 и Xth по отношению к одноцепочечному субстрату была гораздо ниже, чем к дуплетному (рис. 2, дорожки 17–19, 21–23). Таким образом, trz-связь, по всей вероятности, устойчива к действию системы эксцизионной репарации оснований. Ранее сообщалось, что эта модификация также не удаляется из ДНК по другому ферментативному пути — системой эксцизионной репарации нуклеотидов [5].

Наличие trz-связи с 3'-стороны от mC также подавляло активность ДНК-гликозилазы ROS1 из *Nicotiana tabacum* — растительного фермента, который катализирует гидролиз N-гликозидной связи и элиминирование 3'-фосфатной группы mC-нуклеотидов в ДНК (данные не приведены). При связывании ДНК ROS1 образует водородные связи с этим фосфатом, необходимые для выворачивания субстратного основания в активный центр фермента [13], что может объяснять исчезновение активности при замене фосфатной группы на метилтриазольную.

Способность ДНК-полимераз KF, RVpol, Pfu и Pol β вести синтез по матрице, содержащей trz-связь, исследовали в двух постановках эксперимента, отражающих два режима синтеза. В первом случае 3'-конец праймера был удален от места модификации на 5 нуклеотидов (субстрат P1//33trz), а во втором (субстрат P2//33trz) — находился непосредственно перед неканонической межнуклеозидной связью. Эксперименты первого типа позволяют установить, с какой эффективностью ДНК-полимеразы способны преодолевать модифицированные звенья в матрице при доступности

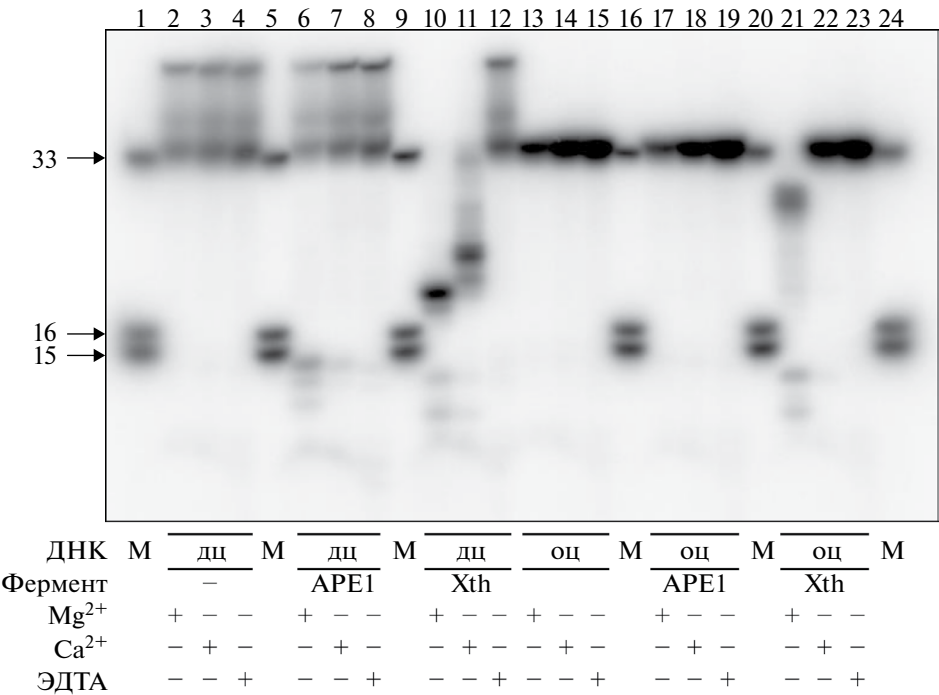


Рис. 2. Репрезентативный радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов расщепления ³²P-меченой цепи ДНК с trz-связью эндонуклеазами APE1 и Xth. Реакцию вели при 37°C в течение 1 ч в буфере, содержащем 20 мМ HEPES–КОН (рН 8.0), 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂ либо CaCl₂ либо 1 мМ этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), 1 мМ дитиотреитол (DTT) и 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина. Концентрация ДНК-субстрата составляла 50 нМ, ферментов – 1 мкМ APE1 либо 10 нМ Xth. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 20%-ном полиакриламидном геле в присутствии 7 М мочевины и анализировали с помощью установки радиолюминесцентного сканирования Typhoon 9500 (GE Healthcare, США). М – смесь маркеров подвижности длиной 15, 16 и 33 нуклеотида (M15, M16 и M33, табл. 1; соответствующие полосы отмечены стрелками); оц – одноцепочечный ДНК-субстрат (33trz, табл. 1); дц – двуцепочечный ДНК-субстрат (33trz//T2, табл. 1).

всех dNTP и в отсутствие влияния модификации на связывание с 3'-концом праймера. В экспериментах второго типа модифицированное звено может изменять как сродство фермента к ДНК-субстрату, так и эффективность стадии включения dNMP, однако в этом случае становится возможным с использованием отдельных dNTP дополнительно установить, какие нуклеотиды преимущественно используются для синтеза напротив неканонического элемента матрицы. Исследованные ферменты относятся к трем основным структурным суперсемействам ДНК-полимераз: А (KF), В (RVpol и Pfu) и Х (Pol β). Главные репликативные полимеразы эукариот (α, δ и ε) входят в суперсемейство В, поэтому RVpol часто используют в качестве удобной модели для исследования механизма действия и субстратной специфичности ДНК-полимераз человека.

KF и RVpol достаточно эффективно удлиняли оба праймера и синтезировали продукты, электрофоретическая подвижность которых указывает на прохождение модифицированного звена и продолжение синтеза после этого (рис. 3а, дорожки 6, 8, 14, 16). Однако на геле была хорошо заметна

полоса, соответствующая удлинению праймера Р2 на 1 звено, что указывает на затрудненный синтез после включения первого нуклеотида. В случае KF и праймера Р1 также наблюдалась полоса, совпадающая по своей подвижности с праймером Р2. Таким образом, KF частично блокируется межнуклеозидной trz-связью, хотя и способен ее проходить. Фермент RVpol, отличающийся очень высокой процессивностью, показывал более высокую способность к прохождению trz-связи при использовании обоих праймеров и не демонстрировал заметных пауз при использовании праймера Р1. Напротив, ДНК-полимераза Pfu, несмотря на свое структурное сходство с RVpol, практически полностью блокировалась trz-связью в обоих режимах синтеза (рис. 3б, дорожки 6, 8), что может быть связано с субоптимальными температурными условиями (37 °С) для этого термофильного фермента. Наряду с этим в отсутствие dNTP отчетливо проявлялась экзонуклеазная активность Pfu (рис. 3б, дорожки 1, 7). Низкопроцессивная ДНК-полимераза β показывала невысокую степень удлинения праймера Р2 и блокировалась при синтезе с праймера Р1 (рис. 3а, дорожки 22, 24).

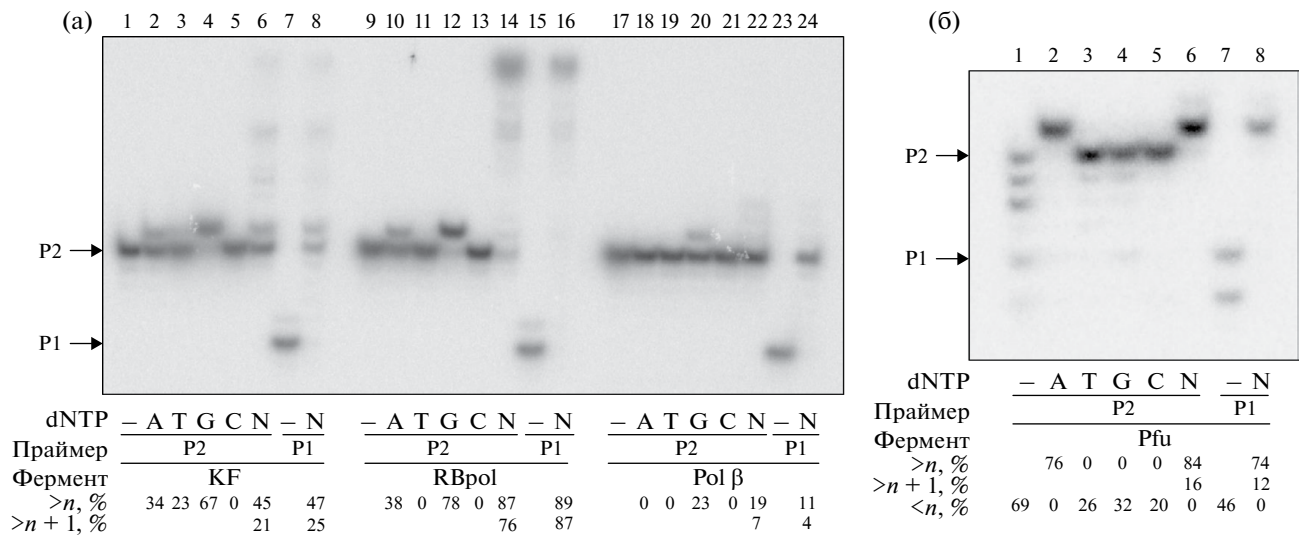


Рис. 3. Репрезентативные радиоавтографы гелей после электрофоретического разделения продуктов синтеза ДНК-полимеразами KF, RBpol, Pol β (а) и Pfu (б) на матрицах с trz-связью. Реакцию вели при 37°C в течение 10 мин (20 мин для Pfu) в буфере, содержащем 50 мМ Трис–HCl (pH 7.5), 5 мМ MgCl₂ (для KF и RBpol) либо 10 мМ MgCl₂ (для Pol β), 1 мМ DTT; либо 20 мМ Трис–HCl (pH 8.8), 10 мМ KCl, 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ MgSO₄, 0.1 %-ный Три-тон X-100 для Pfu. Концентрация ДНК-субстрата с ³²P-меченым праймером составляла 50 нМ, dNTP – 500 мкМ (индивидуальные dNTP либо их эквимольная смесь), ДНК-полимераз – 0.1 ед. акт./мкл (Pfu) либо 10 нМ (прочие полимеразы). Продукты реакции анализировали, как описано выше. P1, P2 – праймеры. Числа под изображениями отражают интенсивность полос, соответствующих включению хотя бы одного нуклеотида при прохождении через trz-связь (> n), одного нуклеотида с последующим удлинением хотя бы одного нуклеотида при прохождении через trz-связь (> n + 1) и экзонуклеолитической деградации праймера (< n).

Использование отдельных dNTP позволило выявить очень высокую частоту ошибок ДНК-полимераз при прохождении trz-связи. Поскольку в матрице в позиции, непосредственно направляющей включение, находится mC, напротив него должен включаться dGMP. В составе ДНК с обычным сахарофосфатным остовом mC узнается ДНК-полимеразами, как обычный C; так, частота ошибочного включения dAMP напротив mC (по сравнению со включением dGMP) составляет ~2.6×10⁻⁴ для KF, ~1.3×10⁻³ для RBpol и ~7.1×10⁻³ для Pol β [14–16]. Однако при наличии trz-связи полимераз RBpol, помимо dGMP, с достаточно высокой эффективностью, включала и dAMP, а полимераз Pfu – исключительно dAMP (рис. 3а, дорожки 10, 12, 3б, дорожка 2). Интересно,

что в присутствии dAMP или смеси dNTP экзонуклеазная активность Pfu не выявлялась, что указывает на повторение цикла удаления и включения dAMP напротив mC[trz] либо на подавление переноса конца праймера в экзонуклеазный центр фермента или гидролиза фосфодиэфирной связи неверно включенного нуклеотида. KF, помимо dGMP, также включал dAMP и dTMP (рис. 3а, дорожки 2–4). Лишь Pol β включала только комплементарный матрице dGMP. Эффективность включения dGMP и dAMP ферментами KF и RBpol также исследовали в режиме стационарной кинетики (табл. 2). Полученные данные в целом соответствуют сравнительным количествам продуктов, образуемых в описанных выше экспериментах, и подтверждают способность KF и RBpol

Таблица 2. Кинетические параметры включения dNMP ДНК-полимеразами при наличии межнуклеозидной триазольной связи

Фермент	dNTP	K_M , мкМ	k_{cat} , с ⁻¹ , ×10 ³	k_{sp} , мкМ ⁻¹ ·с ⁻¹ , ×10 ⁴	$k_{sp(dGTP)}/k_{sp(dATP)}$
KF	dATP	11 ± 2	1.7 ± 0.1	1.5 ± 0.3	2.7
	dGTP	12 ± 2	4.8 ± 0.2	4.0 ± 0.7	
RBpol	dATP	66 ± 21	2.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	8.5
	dGTP	82 ± 34	28 ± 5	3.4 ± 1.5	

Приведена средняя и стандартная ошибка определения коэффициентов нелинейной регрессии по 3 независимым экспериментам

проходить межнуклеозидную trz-связь в высокоошибочном режиме. При этом RVpol показывала более высокую точность (соотношение констант специфичности для правильного и неправильного включения), что было обусловлено более высокой константой скорости реакции.

Таким образом, trz-связь индуцирует поведение ДНК-полимераз KF, RVpol и Pfu, напоминающее “правило А” — предпочтительное включение dAMP (и в меньшей степени dGMP) при невозможности образовать комплементарные связи [17]. Механизмы этого явления изучены достаточно хорошо и отличаются для ДНК-полимераз суперсемейств А и В: первые подставляют вместо матричного азотистого основания консервативный остаток Туг для образования псевдокомплементарной пары в активном центре, а вторые предпочитают dAMP из-за высокой энергии стэкинга основания Ade с основанием 3'-концевого нуклеотида праймера [18, 19]. Вполне возможно, что планарная структура триазольной группы и возможность вращения вокруг ее связей с нуклеозидами с 5'- и 3'-стороны позволяет активным центрам ДНК-полимераз образовывать с ней стабилизирующие псевдокомплементарные или стэкинг-взаимодействия и включать нуклеотиды, не соответствующие следующему матричному основанию. Любопытно, что праймер Р2, 3'-конец которого находится непосредственно вблизи trz-связи, образовывал с матричной цепью 33trz более стабильный дуплекс, чем с цепью 33mC ($T_{пл} = 73.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $71.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ соответственно), что может указывать на стэкинг-взаимодействие триазольного кольца с терминальным азотистым основанием праймера. Pol β не использует механизмы стэкинга и замещения основания при прохождении неинструктивных нуклеотидов [20], что может объяснять ее относительно более высокую точность при наличии trz-связи.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что trz-связи могут быть не столь хорошо совместимы с молекулярно-генетическими процессами, как предполагалось ранее. Вероятно, они действительно не подвергаются репарации в клетках, по крайней мере по путям эксцизионной репарации оснований и нуклеотидов. Однако при синтезе цепи ДНК-полимеразами разных семейств в области trz-связей могут легко возникать замены, что снижает точность сборки генов с помощью клик-лигирования и несет риск мутаций при репликации такой синтетической ДНК *in vivo*.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда 21-74-10104 (биохимические эксперименты) и частично госзадаaniem ИХБФМ СО РАН (121031300056-8).

ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

Соблюдение этических стандартов: в данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., et al. A step-wise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective ligation of azides and terminal alkynes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, vol. 41, no. 14, pp. 2596–2599.
2. Tornøe C.W., Christensen C., and Meldal M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-Triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides, *J. Org. Chem.* 2002, vol. 67, no. 9, pp. 3057–3064.
3. Gierlich J., Burley G.A., Gramlich P.M.E., et al. Click chemistry as a reliable method for the high-density postsynthetic functionalization of alkyne-modified DNA, *Org. Lett.*, 2006, vol. 8, no. 17, pp. 3639–3642.
4. Seela F., and Sirivolu V.R. DNA containing side chains with terminal triple bonds: Base-pair stability and functionalization of alkynylated pyrimidines and 7-deazapurines, *Chem. Biodivers.*, 2006, vol. 3, no. 5, pp. 509–514.
5. El-Sagheer A.H., Sanzone A.P., Gao R., et al. Biocompatible artificial DNA linker that is read through by DNA polymerases and is functional in *Escherichia coli*, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 2011, vol. 108, no. 28, pp. 11338–11343.
6. Sanzone A.P., El-Sagheer A.H., Brown T., and Tavasoli A. Assessing the biocompatibility of click-linked DNA in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.*, 2012, vol. 40, no. 20, pp. 10567–10575.
7. Dallmann A., El-Sagheer A.H., Dehmel L., et al. Structure and dynamics of triazole-linked DNA: Biocompatibility explained, *Chemistry*, 2011, vol. 17, no. 52, pp. 14714–14717.
8. El-Sagheer A.H., and Brown T. New strategy for the synthesis of chemically modified RNA constructs exemplified by hairpin and hammerhead ribozymes, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 2010, vol. 107, no. 35, pp. 15329–15334.
9. El-Sagheer A.H., and Brown T. Efficient RNA synthesis by *in vitro* transcription of a triazole-modified DNA template, *Chem. Commun.*, 2011, vol. 47, no. 44, pp. 12057–12058.
10. Rothwell P.J., and Waksman G. Structure and mechanism of DNA polymerases, *Adv. Protein Chem.*, 2005, vol. 71, pp. 401–440.

11. Endutkin A.V., Yudkina A.V., Zharkov T.D., et al. Recognition of a clickable abasic site analog by DNA polymerases and DNA repair enzymes, *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, vol. 23, no. 21, 13353.
12. Ishchenko A.A., Ide H., Ramotar D., et al. α -Anomeric deoxynucleotides, anoxic products of ionizing radiation, are substrates for the endonuclease IV-type AP endonucleases, *Biochemistry*, 2004, vol. 43, no. 48, pp. 15210–15216.
13. Du X., Yang Z., Xie G., et al. Molecular basis of the plant ROS1-mediated active DNA demethylation, *Nat. Plants*, 2023, vol. 9, no. 2, pp. 271–279.
14. Shen J.-C., Creighton S., Jones P.A., and Goodman M.F. A comparison of the fidelity of copying 5-methylcytosine and cytosine at a defined DNA template site, *Nucleic Acids Res.*, 1992, vol. 20, no. 19, pp. 5119–5125.
15. Zahn K.E., Averill A., Wallace S.S., and Doublié S. The miscoding potential of 5-hydroxycytosine arises due to template instability in the replicative polymerase active site, *Biochemistry*, 2011, vol. 50, no. 47, pp. 10350–10358.
16. Howard M.J., Foley K.G., Shock D.D., et al. Molecular basis for the faithful replication of 5-methylcytosine and its oxidized forms by DNA polymerase β , *J. Biol. Chem.*, 2019, vol. 294, no. 18, pp. 7194–7201.
17. Taylor J.-S. New structural and mechanistic insight into the A-rule and the instructional and non-instructional behavior of DNA photoproducts and other lesions, *Mutat. Res.*, 2002, vol. 510, no. 1–2, pp. 55–70.
18. Obeid S., Baccaro A., Welte W., et al. Structural basis for the synthesis of nucleobase modified DNA by *Thermus aquaticus* DNA polymerase, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 2010, vol. 107, no. 50, pp. 21327–21331.
19. Xia S., Vashishtha A., Bulkley D. et al. Contribution of partial charge interactions and base stacking to the efficiency of primer extension at and beyond abasic sites in DNA, *Biochemistry*, 2012, vol. 51, no. 24, pp. 4922–4931.
20. Beard W.A., Shock D.D., Batra V.K. et al. DNA polymerase β substrate specificity: Side chain modulation of the “A-rule”, *J. Biol. Chem.*, 2009, vol. 284, no. 46, pp. 31680–31689.

ERROR-PRONE DNA SYNTHESIS ON CLICK-LIGATED TEMPLATES

A. V. Endutkin¹, A. O. Yakovlev^{1, 2}, V. M. Golyshev¹, T. D. Zharkov¹,
A. V. Yudkina¹, Corresponding Member of the RAS D. O. Zharkov^{1, 2, #}

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

²Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

[#]e-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru

Click ligation is a technology of joining DNA fragments based on azide–alkyne cycloaddition. In the most common variant, click ligation introduces a 4-methyl-1,2,3-triazole (trz) group instead of the phosphodiester bond between two adjacent nucleosides. While this linkage is believed to be biocompatible, little is known about the possibility of its recognition by DNA repair systems or its potential for DNA polymerase stalling and miscoding. Here we report that trz linkage is resistant to several human and bacterial endonucleases involved in DNA repair. At the same time, it strongly blocks some DNA polymerases (Pfu, DNA polymerase β) while allowing bypass by others (phage RB69 polymerase, Klenow fragment). All polymerases except for DNA polymerase β showed high frequency of misinsertion at the trz site, incorporating dAMP instead of the next complementary nucleotide. Thus, click ligation may be expected to produce a large amount of errors if used in custom gene synthesis.

Keywords: click chemistry; DNA polymerases; replication; mutations; DNA repair; AP endonucleases.

УДК 577.214.5:575.174.015.3

ЦИРКАДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МЕТАБОЛИЗМА КАРОТИНОИДОВ (*PSY2*, *LCYE*, *CRTRB1*, *NCED1*) В ЛИСТЬЯХ ТОМАТА *SOLANUM LYCOPERSICUM* L.

© 2024 г. М. А. Филюшин¹*, А. В. Щенникова¹, Е. З. Кочиева

Представлено академиком В. О. Поповым

Поступило 24.06.2024 г.

После доработки 30.06.2024 г.

Принято к публикации 30.06.2024 г.

Охарактеризована циркадная динамика экспрессии ключевых генов метаболизма каротиноидов (*PSY2*, *LCYE*, *CRTRB1*, *NCED1*) в фотосинтезирующей ткани растений томата *Solanum lycopersicum* L. (сорт Корнеевский). Осуществлен *in silico* анализ профиля экспрессии генов и обнаружен высокий уровень их транскриптов в листовой ткани растения томата. Проведен анализ (ПЦР-РВ) профиля экспрессии генов в шести временных точках в течение суток и показано, что наибольший уровень транскриптов *PSY2*, *LCYE* и *NCED1* приходится на вторую половину световой фазы, тогда как *CRTRB1* – на окончание темновой фазы. Определено содержание и состав каротиноидов в листовой ткани в середине дневного периода и показано, что соединений ϵ/β -ветви биосинтеза каротиноидов накапливается в 1.5 раза больше, чем соединений β/β -ветви.

Ключевые слова: томат, *Solanum lycopersicum*, метаболизм каротиноидов, циркадный ритм

DOI: 10.31857/S2686738924050191

Каротиноиды представляют собой пигменты, используемые растением в первую очередь в качестве вспомогательных соединений для фотосинтеза и фотозащиты, а также для окраски тканей генеративных и запасающих органов (лепестков, плодов, зерен, др.) [1–3]. Апокаротиноиды, являющиеся производными каротиноидов, включают фитогормоны (стриголактоны, абсцизовая кислота (АБК)) и другие биологически активные соединения, незаменимые для онтогенеза и адаптивных реакций растения [1–3].

Путь биосинтеза каротиноидов начинается с образования 15-*цис*-фитоина, катализируемого фитинсинтазой *PSY* [1]. На примере многих видов растений показано существование трех изоферментов *PSY1–3*, осуществляющих главную консервативную функцию (катализ синтеза фитоина) [2, 3]. Детальная характеристика кодирующих их генов у томата (*Solanum lycopersicum* L.) и кукурузы (*Zea mays* L.) выявила характерные особенности каждого из них, заключающиеся в преимущественной

активности в плодах/зернах (*PSY1*) и листьях (*PSY2*) или значимой транскрипцией в корнях только в ответ на стрессовые факторы (*PSY3*) [2, 3]. Для фотосинтезирующих тканей наиболее важен хлоропласт-специфичный изофермент *PSY2*, регуляция экспрессии которого светочувствительна и, как следствие, колеблется в соответствии с циркадными ритмами [3, 4]. Кроме того, именно активность *PSY2* связывают с усилением синтеза АБК в семенах и корнях растений томата в условиях солевого стресса [3].

После образования *транс*-ликопина путь биосинтеза каротиноидов расходится на две ветви – β/β (образуются β -каротин и ксантофиллы виолаксантинного цикла) и ϵ/β (α -каротин и ксантофиллы лютеинового цикла), первыми ферментами, в которых являются ликопин- β -циклаза (*LCYB*) и ликопин- ϵ -циклаза (*LCYE*), соответственно [1]. Ветвь β/β снабжает растение фитогормонами и основными предшественниками витамина А (β -каротин и β -криптоксантин, получаемый из β -каротина с помощью β -каротингидроксилазы 1 (*CrtRB1*)) [5, 6]. Гормон АБК, в частности, образуется путем окислительного расщепления неоксантина и виолаксантина 9-*цис*-эпоксикаротиноид-диоксигеназами (*NCED*) [7, 8]. Ключевая роль здесь приписывается изоферменту *NCED1* на основании данных

¹Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук», Москва, Россия
*e-mail: michel7753@mail.ru

исследования развития плода и стрессоустойчивости растений томата [8–10].

Наша работа была сфокусирована на определении циркадной динамики экспрессии четырех ключевых генов метаболизма каротиноидов (*PSY2*, *LCYE*, *CrtRB1*, *NCED1*) в фотосинтезирующей ткани *S. lycopersicum*.

Изучение каротиногенеза у томата в основном ограничено работами по окраске плода и механизмах устойчивости к некоторым стрессовым факторам и не касается суточных колебаний генной экспрессии [3, 8–10]. Однако, это важно для онтогенеза растения с учетом, к примеру, светочувствительной регуляции генов и длительности фотопериода. В зависимости от времени суток происходит открытие и закрытие устьиц на поверхности листа — процесс, который модулируется с помощью АБК и который влияет на степень засухоустойчивости растения [11].

Некоторые сведения о циркадной динамике анализируемых нами генов можно почерпнуть из работ по кукурузе, водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* и *Arabidopsis thaliana* L.: наибольшие уровни экспрессии *PSY2*, *LCY* и *NCED* регистрируются в световой фазе суток (начало, середина и конец дня соответственно) [12–14]. В случае гена *CrtRB1* сведений не найдено.

Используя доступные транскриптомные данные модельных сортов томата (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr/>), мы провели предварительный анализ профиля экспрессии генов *PSY2*, *LCYE*, *CrtRB1* и *NCED1* в различных органах растения с целью оценки возможной активности генов в фотосинтезирующей ткани листа. Логично предположить, что ткани для транскриптомного анализа собирали в дневное время, и что это время может отличаться для разных тканей.

В результате было показано, что уровень экспрессии всех четырех генов очень низок в корнях, но высок в листьях, где количество транскриптов *PSY2* и *LCYE* в 3–4 раза выше, чем у *CrtRB1* и *NCED1* (рис. 1). Это подтверждает роль данных генов в фотосинтезе растения, а также в образовании гормона АБК, необходимого для развития. Также, относительно высокий уровень транскриптов наблюдался в бутонах цветка (*PSY2*, *CrtRB1*) и плодах по мере созревания (*NCED1*) (рис. 1). Это свидетельствует о возможном вспомогательном участии роли *PSY2* в каротиногенезе в запасующих тканях цветка и о необходимости *NCED1* для синтеза АБК в созревающем плоде, что согласуется с данными [3, 8–10].

Определение циркадной динамики экспрессии генов *PSY2*, *LCYE*, *CrtRB1* и *NCED1* в листьях *S. lycopersicum* было проведено на сорте Корнеевский. Проростки томата были выращены до стадии 5–7 листа (экспериментальная установка искусственного климата, ФИЦ Биотехнологии РАН). С учетом условий культивирования (день/

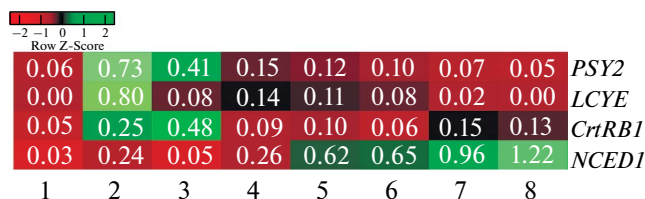


Рис. 1. Тепловая карта экспрессии генов *PSY2* (Solyc02g081330; NCBI gene ID 543964), *LCYE* (Solyc12g008980; 544129), *NCED1* (Solyc07g056570; 544163) и *CrtRB1* (Solyc06g036260; 544133) в растении томата сорта Heinz (*S. lycopersicum*), построенная по транскриптомным данным TomExpress (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr/>). Анализируемые органы: корень (1); лист (2); бутон (3); плод диаметром 1 (4), 2 (5) и 3 (6) см; плод незрелый финального размера (7); плод на стадии смены окраски с зеленой на красную (8). Визуализация данных (<http://www2.heatmapper.ca/expression/>) проведена на основании значений FPKM (Fragments per kilo base of transcript per million mapped fragments), указанных в боксах (округлены до второго знака после запятой).

ночь — 16 ч/8 ч; световая фаза с 7.00 до 23.00) были выбраны шесть временных точек (3.00, 6.00, 8.00, 15.00, 22.00, 24.00), в которых с проростков были собраны листья. Из листьев были получены препараты суммарной РНК и кДНК (RNeasy Plant Mini Kit, RNase-free DNase set, QIAGEN, Германия; GoScript Reverse Transcription System, Promega, США). Анализ экспрессии генов *PSY2*, *LCYE*, *CrtRB1* и *NCED1* был проведен с помощью количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ; программа [5 мин 95°C, 40 циклов (15 с 95°C; 40 с 60°C)]) в системе CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories, США) с использованием набора “Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I и ROX” (ООО «Синтол», Россия).

В результате было показано, что уровни экспрессии каждого гена достоверно различаются между временными точками, кроме *PSY2* (15.00 vs. 22.00; 6.00 vs. 8.00), *LCYE* (6.00 vs. 8.00) и *NCED1* (3.00 vs. 8.00, 24.00; 6.00 vs. 15.00, 22.00) (рис. 2а).

Пик активности *PSY2*, *LCYE* и *NCED1* пришелся на вторую половину дня. В начале темновой фазы (24.00) экспрессия всех трех генов *PSY2*, *LCYE* и *NCED1* снижалась, однако далее динамика была индивидуальной. К 3.00 (vs. 24.00) уровень транскриптов *NCED1* не менялся, *PSY2* повышался и *LCYE* уменьшался, тогда как к концу ночи (6.00 vs. 3.00) уровень транскриптов *NCED1* увеличивался, *PSY2* снижался и *LCYE* уменьшался (рис. 2а). Полученные данные о преимущественной активности генов *PSY2* и *LCYE* в дневное время согласуются с известным участием каротиноидов в поглощении света и защите молекул хлорофиллов от не обратимого фотоокисления [1] и с тем, что днем

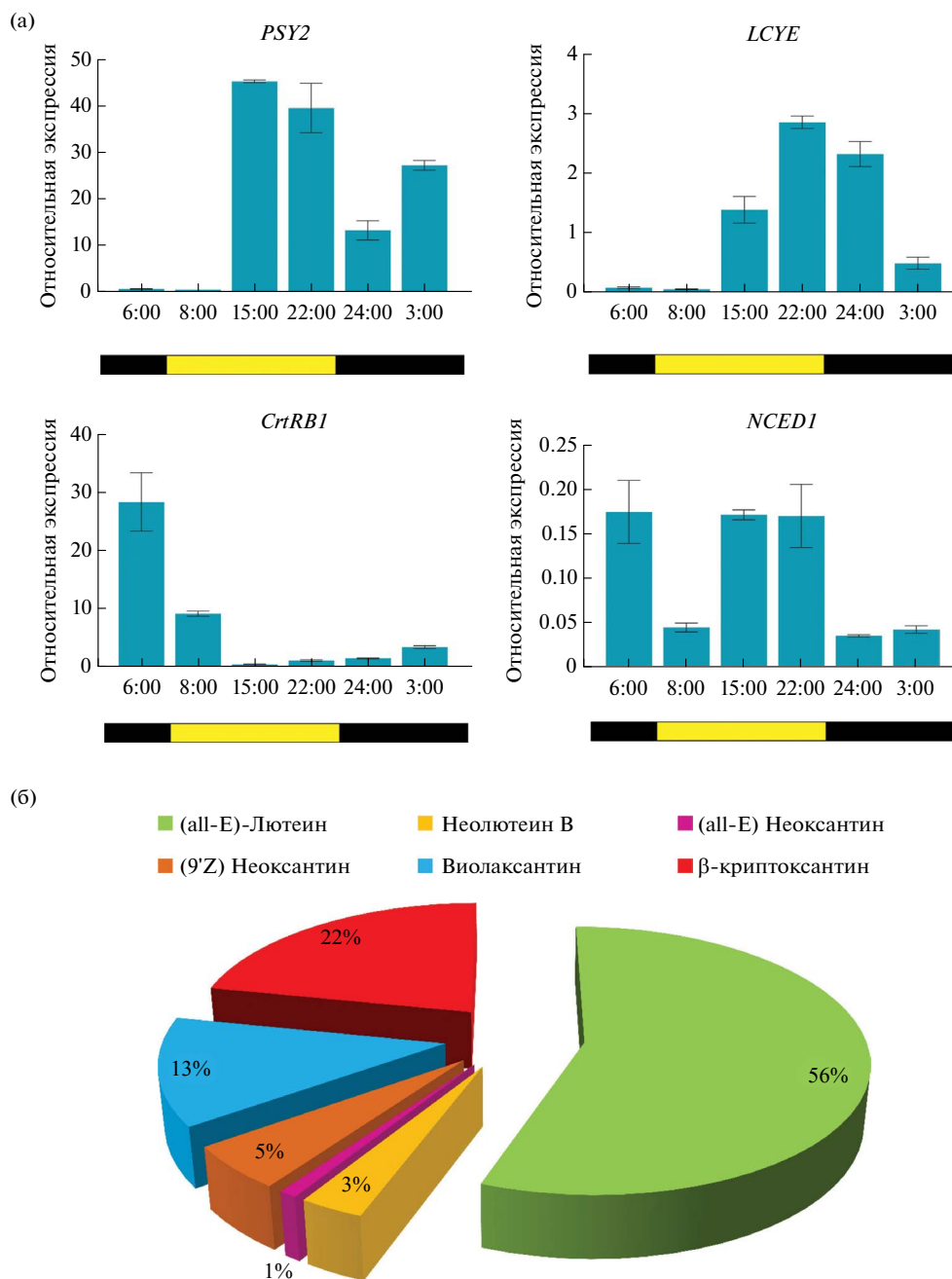


Рис. 2. (а) Суточная динамика экспрессии генов *PSY2* (Solyc02g081330; NCBI gene ID 543964), *LCYE* (Solyc12g008980; 544129), *NCED1* (Solyc07g056570; 544163) и *CrtRBI* (Solyc06g036260; 544133) в листовой ткани проростков образцов томата сорта Корнеевский. Дневной и ночной периоды обозначены под графиками белым и серым боксами соответственно. Праймеры: *PSY2* (5'-aactgagctctgctagtagatg-3', 5'-gcactagagatcttgcataagca-3'); *LCYE* (5'-tatgtcagacacgacgctcaat-3', 5'-catgctagcagcagcacca-3'); *NCED1* (5'-tgctcttagctacgatgtgat-3', 5'-gcgaatcatgcatcattgttg-3'); *CrtRBI* (5'-cactcttatcaatgaggaagg-3', 5'-cttactgaataagagaccta-3'). Данные нормализованы по двум референсным генам *Expressed* (gene ID 101263039; 5'-gctaagaacgctggaccta-3', 5'-tgggtgtgcctttctgaatg-3') и *actin-7* (101262163; 5'-cattgtgctcagtggtgttc-3', 5'-tctgctggaaggtgctaagt-3'). Согласно результатам статистического анализа данных (Two-way ANOVA; GraphPad Prism v. 8, GraphPad Software Inc., США; <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>), уровни экспрессии каждого гена достоверно различаются ($p < 0.05$) между временными точками, кроме *PSY2* (15.00 vs. 22.00; 6.00 vs. 8.00), *LCYE* (6.00 vs. 8.00) и *NCED1* (3.00 vs. 8.00, 24.00; 6.00 vs. 15.00, 22.00). (б) Состав каротиноидов (%) в листьях проростков томата сорта Корнеевский, собранных в середине дневной фазы фотосинтеза (15.00). Суммарное количество каротиноидов – 307.3 мкг/г сырого веса. Суммарное содержание каротиноидов (мг/г сырого веса) и их состав (% от суммы каротиноидов отдельных соединений) определяли согласно [15] в двух биологических и трех технических повторях.

содержание каротиноидов в листьях обычно растёт, а ночью падает [6]. Сходная по уровню экспрессия *NCED1* в световой и темновой фазах находится в соответствии с участием гена в синтезе гормона АБК как необходимой составляющей постоянно идущего развития растения [7, 8]. В сравнении с данными о циркадной экспрессии гомологичных генов у других видов растений [12–4], у томата ген *PSY2* показал сходный профиль экспрессии, тогда как профиль *LCYE* и *NCED1* имел некоторые отличия, что может указывать на видоспецифичную регуляцию данных генов.

В противоположность генам *PSY2*, *LCYE* и *NCED1*, пик активности *CrtRBI* пришелся на конец ночи (6.00). В начале световой фазы (8.00) экспрессия гена снизилась почти в 3 раза и дальше (15.00) продолжила падение до следовых значений: в самом конце световой фазы начался постепенный рост уровня транскриптов *CrtRBI* (рис. 2а). Исходя из этого, можно предположить, что преобразование β -каротина в β -криптоксантин наиболее интенсивно происходит на стыке ночи и дня (6.00–8.00), что может быть связано с наработкой ксантофиллов виолаксантинового цикла (β/β -ветвь) в количестве, необходимом растению для участия в наступающем фотопериоде. При этом низкий уровень дневной экспрессии *CrtRBI* может свидетельствовать о наработке ксантофиллов лютеинового цикла, синтезируемых ϵ/β -ветвью и участвующих в дневном поглощении света и защите хлорофилла.

Чтобы прояснить данный вопрос, мы провели HPLC-анализ содержания и состава каротиноидов (согласно [15]) в листовой ткани растения томата, собранной в 15.00. В результате было показано, что большая часть (~60%) каротиноидов представлена производными лютеина, и 40% – ксантофиллами виолаксантинового цикла (рис. 2б). Таким образом, соединения ϵ/β -ветви могут выполнять большую (в сравнении с β/β) часть функции каротиноидов в фотосинтезе и фотозащите, поскольку ксантофиллы β/β -ветви активно расходуются на синтез необходимых растению фитогормонов.

Отдельно заметим, что снижение экспрессии гена *CrtRBI* может способствовать накоплению β -каротина, а высокий уровень транскриптов *LCYE* – накоплению α -каротина [1, 5, 6]. Однако в середине дня (15.00) при следовых количествах транскриптов гена *CrtRBI* и существенных *LCYE* (рис. 2а) ни β -каротина, ни α -каротина в составе каротиноидов обнаружено не было (рис. 2б).

Таким образом, впервые была определена циркадная динамика экспрессии ключевых генов метаболизма каротиноидов в фотосинтезирующей ткани томата. Было показано, что профиль экспрессии гена *PSY2* может носить консервативный характер у видов растений, тогда как *LCYE* и *NCED1* могут иметь видоспецифичные особенности. Суточная динамика экспрессии *CrtRBI* была для растений

определена впервые. Наибольшая активность генов *PSY2* и *LCYE* была зарегистрирована в световой фазе суток, что согласуется с усиленным накоплением каротиноидов и их ролью в фотосинтезе и фотозащите растения. Максимальные уровни транскриптов гена *NCED1* предполагают усиленный синтез фитогормона АБК во второй половине световой фазы и в конце темновой фазы. Показана сопоставимая по количеству дневная наработка ксантофиллов виолаксантинового и лютеинового циклов, при этом меньшее количество первых может указывать на активную переработку соединений на фитогормоны.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 24-16-00043, подготовка растительного материала, экспрессионный анализ) и Министерства образования и науки РФ (биохимический анализ).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stra A., Almarwaey L.O., Alagoz Y., et al. // Front. Plant Sci. 2023. V. 13. 1072061.
2. Stauder R., Welsch R., Camagna M., et al. // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. 255.
3. Li F., Vallabhaneni R., Yu J., Rocheford T., et al. // Plant Physiol. 2008. V. 147(3). P. 1334–1346.
4. Ezquerro M., Burbano-Eraza E., Rodriguez-Concepcion M. // Plant Physiol. 2023. V. 193(3). P. 2021–2036.
5. LaPorte M.F., Vachev M., Fenn M., et al. // G3 (Bethesda). 2022. V. 12(3). jkac006.
6. Hu L., Feng S., Liang G., et al. // AMB Express. 2021. V. 11(1). 83.
7. López-Ráez J.A., Kohlen W., Charnikhova T., et al. // New Phytol. 2010. V. 187. P. 343–354.
8. Zhang M., Yuan B., Leng P. // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. P. 1579–1588.
9. Kai W., Fu Y., Wang J., Liang B., et al. // Sci Rep. 2019. V. 9. 16943.
10. Yang R., Yang T., Zhang H., et al. // Plant Physiol. Biochem. 2014. V. 77. P. 23–34.
11. Yari Kamrani Y., Shomali A., Aliniaieifard S., et al. // Cells. 2022. V. 11(7). 1154.

12. Li F., Vallabhaneni R., Yu J., Rocheford T., et al. // Plant Physiol. 2008. V. 147. P. 1334–1346.
13. Sun T.H., Liu C.Q., Hui Y.Y., et al. // J. Integr. Plant Biol. 2010. V. 52. P. 868–878.
14. Baek D., Kim W.Y., Cha J.Y., et al. // Plant Physiol. 2020. V. 184(1). P. 443–458.
15. Efremov G.I., Ashikhmin A.A., Shchennikova A.V., et al. // Russian Journal of Plant Physiology. 2023. V. 70(2). P. 17

CIRCADIAN REGULATION OF EXPRESSION OF CAROTENOID METABOLISM GENES (*PSY2*, *LCYE*, *CRTRB1*, *NCED1*) IN LEAVES OF TOMATO *SOLANUM LYCOPERSICUM* L.

M. A. Filyushin^{1, #}, A. V. Shchennikova¹, E. Z. Kochieva¹

Presented by Academician of the RAS V.O. Popov

¹*Institute of Bioengineering, Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: michel7753@mail.ru*

The circadian dynamics of the expression of key genes of carotenoid metabolism (*PSY2*, *LCYE*, *CrtRB1*, and *NCED1*) in the photosynthetic tissue of tomato *Solanum lycopersicum* L. (cultivar Korneevsky) plants was characterized. An *in silico* analysis of the gene expression pattern was carried out and a high level of their transcripts was detected in the leaf tissue. qRT-PCR analysis of gene expression was performed at six time points during the day and found the highest levels of *PSY2*, *LCYE* and *NCED1* transcripts in the second half of the light phase, and *CrtRB1* – at the end of the dark phase. The content and composition of carotenoids in leaf tissue in the middle of the day was determined and it was shown that the leaf accumulates 1.5 times more compounds of the ϵ/β -branch of carotenoid biosynthesis pathway than compounds of the β/β -branch.

Keywords: tomato, *Solanum lycopersicum*, carotenoid metabolism, circadian rhythm