



ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 508, 2023

Прогнозирование урожайности картофеля перспективных отечественных сортов в условиях воздействия стрессовых абиотических факторов

О. А. Розеницет, Е. С. Богданова, В. Н. Нестеров, А. Л. Бакунов,
А. В. Милехин, С. Л. Рубцов, Н. Н. Дмитриева, С. Н. Шевченко

5

Функциональная диверсификация каротиноид-цис-транс-изомераз CrtISO, CrtISO-L1 и CrtISO-L2 у видов томата (*Solanum*, секция *Lycopersicon*)

Г. И. Ефремов, А. В. Щенникова, Е. З. Кочиева

9

Новая технология восстановления локомоции у пациентов после инсульта

Т. Р. Мошонкина, Е. Н. Жарова, С. С. Ананьев, Н. Д. Шандыбина, Е. А. Вершинина,
В. А. Ляховецкий, А. А. Гришин, Е. В. Шляхто, Ю. П. Герасименко

14

Уровень кортизола и активность Na^+/K^+ -АТФазы в процессе роста и развития молоди лептоклина пятнистого *Leptoclinus maculatus* (Fries, 1838) в Арктике

Н. Л. Рендаков, Е. И. Кайвярайнен, С. Н. Пеккоева, С. А. Мурзина, К. М. Никерова

19

Синтез меченного дейтерием пирролилкарнозина

В. П. Шевченко, И. Ю. Нагаев, Т. Н. Федорова, Н. Ф. Мясоедов

23

Стимуляция овуляции у неполовозрелых самок крыс с помощью ортостерического и аллостерического агонистов рецептора лютеинизирующего гормона

Е. А. Фокина, К. В. Деркач, А. А. Бахтюков, В. Н. Сорокоумов,
И. А. Лебедев, И. Ю. Морина, А. О. Шпаков

30

Синтез 1-[ω-(бромфенокси)алкил]-3-нафталенилметил-производных урацила и их аналогов как вероятных ингибиторов репликации цитомегаловируса человека

М. П. Парамонова, Е. С. Гуреева, А. А. Озеров, R. Snоек, G. Andrei, Д. А. Александров,
А. Л. Хандажинская, М. С. Новиков, С. Н. Кочетков

35

Субпопуляционная гетерогенность НК-клеток при их генетической модификации с целью последующего применения в таргетной терапии

М. А. Стрельцова, А. А. Бойко, М. О. Устюжанина, А. И. Паламарчук, Н. А. Алексеева,
Р. А. Величинский, Ю. Д. Вавилова, М. В. Гречихина,
А. М. Сапожников, С. М. Деев, Е. И. Коваленко

41

Содержание докозагексаеновой кислоты в грудных мышцах птиц связано с частотой взмахов крыльев

М. И. Гладышев

45

Синергический эффект комбинированного действия таргетной и фотодинамической терапии в отношении HER2-положительного рака молочной железы

И. В. Балалаева, Л. В. Крылова, М. А. Карпова, А. А. Шульга,
Е. В. Коновалова, Е. Л. Гурьев, С. М. Деев

48

Биологическая активность и вероятные механизмы действия производных алкалоидов триптантрина и мостотрина

А. М. Попов, Л. Г. Деженкова, Т. В. Московкина, Н. Э. Грамматикова, А. С. Кузьмич,
О. В. Черников, А. Е. Щекотихин, В. А. Стоник

53

Первая находка *Eothenomys* (Arvicolinae, Cricetidae, Rodentia) в плейстоцене Вьетнама

А. В. Лопатин

58

Новые данные о морфологии зубов <i>Hipparion tchicoicum</i> Ivanjev, 1966 из Западного Забайкалья (Россия)	63
<i>Н. П. Калмыков</i>	
Организация цераты голожаберного моллюска <i>Pteraeolidia semperi</i> (Gastropoda, Nudibranchia)	68
<i>О. А. Воробьева, И. А. Екимова, В. В. Малахов</i>	
Пространственная экология лесного северного оленя (<i>Rangifer tarandus valentinae</i> Flerov, 1932) Кузнецкого Алатау	73
<i>А. А. Васильченко, С. В. Найдено, М. Д. Чистополова, В. В. Рожнов</i>	
Находка погонофор (Annelida, Siboglinidae) в желобе Святой Анны (Карское море) в районе диссоциации газогидратов	79
<i>Н. Н. Римская-Корсакова, Н. П. Карасева, А. А. Осадчиев, И. П. Семилетов, М. М. Ганцевич, Д. А. Юрикова, В. В. Малахов</i>	
Новые виды растений, проявляющие антипротозойную активность	84
<i>Е. Г. Черемных, А. В. Осипов, В. Г. Старков, Ч. Т. Т. Нгуен (Nguyen Thi Thuy Trang), Х. К. Нгуен (Nguyen Cui Khoa), А. Н. Хоанг (Hoang Ngoc Anh), З. Т. Ле (Le Tien Dung), В. И. Цетлин, Ю. Н. Уткин</i>	
Ко-репрессор NCoR взаимодействует с транскрипционным фактором Kaiso по механизму, отличному от его взаимодействия с BCL6	91
<i>К. И. Балагуров, П. Г. Георгиев, А. Н. Бончук</i>	
Раннеплейстоценовый кожан <i>Eptesicus praeglacialis</i> (Vespertilionidae, Chiroptera) из пещеры Таврида в Крыму	95
<i>А. В. Лопатин</i>	

CONTENTS

Vol. 508, 2023

Prognostic of Yield of Potatoes of Promising Domestic Varieties under the Impact of Stress Abiotic Factors

O. A. Rozentsvet, E. S. Bogdanova, V. N. Nesterov, A. L. Bakunov, A. V. Milekhin, S. L. Rubtsov, N. N. Dmitrieva, and S. N. Shevchenko 5

Functional Diversification of the Carotenoid-*cis-trans*-Isomerases CrtISO, CrtISO-L1, and CrtISO-L2 in Tomato Species (*Solanum*, section *Lycopersicon*)

G. I. Efremov, A. V. Shchennikova, and E. Z. Kochieva 9

A New Technology for Recovery of Locomotion in Patients after a Stroke

T. R. Moshonkina, E. N. Zharova, S. S. Ananov, N. D. Shanybina, E. A. Vershinina, V. A. Lyakhovetskii, A. A. Grishin, E. V. Shlyakhto, and Y. P. Gerasimenko 14

Cortisol Level and Na^+/K^+ -Atpase Activity During Growth and Development of Juvenile Daubed Shanny *Leptoclinus Maculatus* (Fries, 1838) in the Arctic

N. L. Rendakov, E. I. Kaivarainen, S. N. Pekkoeva, S. A. Murzina, and K. M. Nikerova 19

Synthesis of Deuterium-Labeled Pyrrolylcarnosine

V. P. Shevchenko, I. Yu. Nagaev, T. N. Fedorova, and N. F. Myasoedov 23

Stimulation of Ovulation in Immature Female Rats Using Orthosteric and Allosteric Luteinizing Hormone Receptor Agonists

E. A. Fokina, K. V. Derkach, A. A. Bakhtuykov, V. N. Sorokoumov, I. A. Lebedev, I. Yu. Morina, and A. O. Shpakov 30

Synthesis of 1-[ω -(bromophenoxy)alkyl]-3-naphthalenylmethyl Derivatives of Uracil and their Analogues as Probable Inhibitors of Human Cytomegalovirus Replication

M. P. Paramonova, E. S. Gureeva, A. A. Ozerova, R. Snoeck, G. Andrei, D. A. Alexandrov, A. L. Handazinskaya, M. S. Novikova, and S. N. Kochetkov 35

Subpopulation Heterogeneity of NK Cells During The Genetic Modification for Subsequent Use in Targeted Therapy

M. A. Streltsova, A. A. Boyko, M. O. Ustiuzhanina, A. I. Palamarchuk, N. A. Alekseeva, R. A. Velichinskii, J. D. Vavilova, M. V. Grechikhina, A. M. Sapozhnikov, S. M. Deev, and E. I. Kovalenko 41

Content of Docosahexaenoic Acid in Pectoral Muscles of Birds Correlates with Wing Beat Frequency

M. I. Gladyshev 45

Synergistic Effect of the Combined Action of Targeted and Photodynamic Therapy on HER2-Positive Breast Cancer

I. V. Balalaeva, L. V. Krylova, M. A. Karpova, A. A. Shulga, E. V. Konovalova, E. L. Guryev, and S. M. Deyev 48

Biological Activity and Probable Mechanisms of Action of Derivatives of Tryptanthrin and Mostotrin Alkaloids

A. M. Popov, L. G. Degenkova, T. V. Moskovkina, N. E. Grammatikova, A. S. Kuzmich, O. V. Chernikov, A. E. Schekotichin, and V. A. Stonik 53

The First Record of *Eothenomys* (Arvicolinae, Cricetidae, Rodentia) from the Pleistocene of Vietnam

A. V. Lopatin 58

New Data on Dental Morphology of <i>Hipparion Tchicoicum</i> Ivanjev, 1966 from Western Transbaikalia (Russia)	63
<i>N. P. Kalmykov</i>	
Morphological Organization of Cerata in a Nudibranch <i>Pteraeolidia Semperi</i> (Gastropoda, Nudibranchia)	68
<i>O. A. Vorobyeva, I. A. Ekimova, and V. V. Malakhov</i>	
Spatial Ecology of the Siberian Forest Reindeer (<i>Rangifer tarandus valentinae</i> Flerov, 1932) of the Kuznetsk Alatau	73
<i>A. A. Vasilchenko, S. V. Naidenko, M. D. Chistopolova, and V. V. Rozhnov</i>	
The Discovery of Pogonophores (Annelida, Siboglinidae) in the St. Anna Trough (Kara Sea) in the Area of Gas Hydrates Dissociation	79
<i>N. N. Rimskaya-Korsakova, N. P. Karaseva, A. A. Osadchiev, I. P. Semiletov, M. M. Gantsevich, D. A. Yurikova, and V. V. Malakhov</i>	
New Plant Species Showing Antiprotozoian Activity	84
<i>E. G. Cheremnykh, A. V. Osipov, V. G. Starkov, Nguyen Thi Thuy Trang, Nguyen Cuu Khoa, Hoang Ngoc Anh, Le Tien Dung, V. I. Tsetlin, and Yu. N. Utkin</i>	
The Ncor Co-repressor Interacts with the Kaiso Transcription Factor Through a Mechanism Different from that of BCL6 Interaction	91
<i>K. I. Balagurov, P. G. Georgiev, and A. N. Bonchuk</i>	
Early Pleistocene Serotine Bat <i>Eptesicus praeglacialis</i> (Vespertilionidae, Chiroptera) from the Taurida Cave in Crimea	95
<i>A. V. Lopatin</i>	

УДК 574/577 +633.491

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ УРОЖАЙНОСТИ КАРТОФЕЛЯ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ СОРТОВ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ СТРЕССОВЫХ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

© 2023 г. О. А. Розенцвет¹, Е. С. Богданова^{1,*}, В. Н. Нестеров¹, А. Л. Бакунов², А. В. Милехин², С. Л. Рубцов², Н. Н. Дмитриева², академик РАН С. Н. Шевченко³

Поступило 23.06.2022 г.

После доработки 15.07.2022 г.

Принято к публикации 15.07.2022 г.

Исследованы 24 сорта картофеля (*Solanum tuberosum* L.) различных групп спелости (раннеспелые, среднеранние и среднеспелые). Картофель выращивали в условиях Среднего Поволжья России в период 2019–2021 гг. С помощью статистических методов установлено, что урожайность раннеспелых и среднеспелых сортов отрицательно связана ($R = -0.97$, $p = 0.04$) со среднесуточной температурой воздуха в вегетационный период. Содержание влаги в почве на глубине 20 см положительно коррелировало с урожайностью среднеранних сортов ($R = 0.97$, $p = 0.04$). Средний вес клубня у раннеспелых сортов оказался чувствительным к росту средних температур ($R = -0.95$, $p = 0.04$). Повышение содержания влаги в почве благоприятно отразилось на среднем весе клубня ($R = 0.98$, $p = 0.04$) у среднеранних и среднеспелых сортов. Содержание влаги в почве имело отрицательную взаимосвязь с количеством клубней у среднеспелых сортов ($R = -0.96$, $p = 0.05$).

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, засушливый климат, урожайность

DOI: 10.31857/S2686738922700019, **EDN:** MTKRVX

Картофель — одна из основных сельскохозяйственных культур, которая играет важную роль в питании людей и обеспечении продовольственной безопасности многих стран мира [1]. Картофель традиционно классифицируется как холодостойкая культура [2]. Эффективным диапазоном температур воздуха для роста его надземной массы является 18–25°C, а оптимальная температура почвы для роста клубней составляет 17–19°C [3]. Повышенный температурный режим и дефицит влаги формируют стрессовые условия, как на стадии всходов, так и клубнеобразования [4]. При тепловом стрессе снижается фотосинтетическая активность [5], замедляются рост и развитие надземной массы [6, 7], подавляются формирование и развитие клубней [8]. Картофель чувствителен

также к засухе из-за неглубокого залегания корневой системы в почве [9, 10]. Дефицит влаги, часто возникающий при тепловом стрессе, также замедляет рост надземной массы [11], укорачивает цикл роста [12] и уменьшает количество [13] и массу клубней [4, 14]. Таким образом, такие абиотические факторы, как высокие температуры воздуха, водный дефицит, засуха, могут привести к резкому снижению экономической урожайности картофеля.

Неблагоприятные последствия стресса можно смягчить путем создания сельскохозяйственных культур с повышенной устойчивостью при использовании различных генетических или биотехнологических подходов [4, 7]. Это предполагает глубокое понимание физиолого-биохимических особенностей данной культуры в целом, а также отдельных групп и генотипов [15]. Цель настоящего исследования состояла в изучении влияния условий вегетации картофеля на урожайность отечественных сортов различных групп спелости.

Объекты исследования: раннеспелые сорта — Барин, Корчма, Купец, Терра, Удача; среднеранние — Гранд, Дебют, Калибр, Красавчик, Нарымская ночь, Краса Мещеры, Сердолик, Сударыня, Третьяковка, Эликсир; среднеспелые — Августин, Брусника, Варяг, Жигулевский, Кумач,

¹ Самарский федеральный исследовательский центр РАН, Институт экологии Волжского бассейна Российской академии наук, Тольятти, Россия

² Самарский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Самарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. Н. М. Тулайкова, Безенчук, Россия

³ Самарский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Самара, Россия

*e-mail: cornales@mail.ru

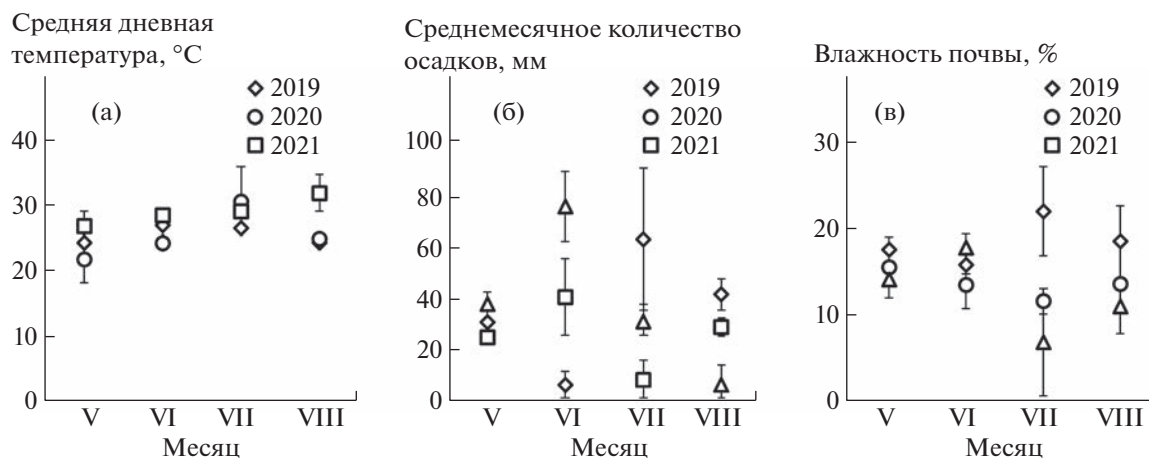


Рис. 1. Динамика средних температур воздуха (а), осадков (б) и содержания влаги в почве (в) в вегетационный период картофеля в течение 2019–2021 гг.

Северное сияние, Сиверский, Сигнал, Утро. Исследования проводили в Самарском НИИСХ — филиале СамНЦ РАН в период 2019–2021 гг. Полевые опыты закладывали в севообороте (предшественник пшеница яровая) при обычной агротехнике без внесения удобрений и дополнительного орошения. Опытный материал высаживали в питомнике сортоиспытания в четырех повторностях. Количество растений в повторности — 50. Посадку проводили в первой-второй декадах мая, уборку осуществляли одновременно для всех сортов в первой декаде сентября. Урожайность каждого сорта оценивали по массе клубней с одного растения (г), количеству клубней на одно растение (шт.) и общей урожайности (т/га). В таблице результаты представлены в виде средних значений параметра (Mean) для каждой группы растений и их стандартных ошибок (SE). Сравнение количественных характеристик данных проводили с использованием дисперсионного анализа (One-way ANOVA) с последующим использованием критерия Тьюки для сравнения средних значений.

Погодные условия в период проведения исследований в течение трех лет различались по температурному режиму и количеству выпавших осадков (рис. 1). Среднесуточная температура воздуха в период от полных всходов до начала отмирания ботвы картофеля в 2019 и 2020 г. составляла 26°C, а в 2021 г. увеличилась до 29°C. Самыми жаркими месяцами были: июнь в (2019 г.), июль (2020 г.), август (2021 г.) (27, 31 и 32°C соответственно) (рис. 1а). В отдельные дни температура воздуха ($T_{\max}$) достигала 33°C (июнь 2019 г.) и 36°C (июль 2020 г.). Количество осадков было неравномерным в течение одного вегетационного сезона и в разные годы исследований. Так, в периоды завязывания клубней и нарастания их массы наибольшее количество осадков отмечали в 2021 г., а наи-

меньшее — в 2019 г. (рис. 1б). Вегетационный период 2019 г. отличался большим количеством осадков, выпавших в июле. Погодные условия отразились на содержании влаги в почве в разные периоды исследований, которая составляла от 5 до 23% от сырого веса почвы (рис. 1в).

Средние значения урожайности сортов картофеля в разных группах спелости варьировали в интервале 14.2–25.7 т/га. Наиболее высокие показатели урожайности отмечены в 2019 г. (табл. 1). Наблюдалось снижение урожайности картофеля всех групп спелости к 2021 г. Для ранних сортов потери урожая составили 13%, для среднеранней и среднеспелой групп потери достигали 32–43%. Во всех группах спелости отмечали снижение массы клубней и увеличение их числа. Установлено, что урожайность (т/га) раннеспелых и среднеспелых сортов отрицательно взаимосвязана ($R = -0.95$, $p = 0.04$; $R = -0.97$, $p = 0.04$ соответственно) с ростом среднесуточной температуры воздуха в вегетационный период. Содержание влаги в почве на глубине 20 см положительно коррелировало с урожайностью среднеранних сортов ($R = 0.97$, $p = 0.04$). Повышение содержания влаги в почве благоприятно отразилось на среднем весе клубня ($R = 0.98$, $p = 0.04$), особенно у генотипов среднеранней и среднеспелой групп.

Для визуализации взаимосвязи урожайности картофеля с гидротермическими условиями и возможного прогнозирования урожайности были построены экспериментальные модели, в которых данные интерпретируются в виде триплета значений, отложенных на XYZ-осях (рис. 2). Согласно полученным данным рост температурных аномалий ($T_{\max}$) отрицательно влияет на урожайность ранних сортов картофеля (рис. 2а). При этом влажность почвы оказывает меньшее влияние на продуктивность этой группы, чем флукту-

Таблица 1. Компоненты урожайности картофеля разных групп спелости в период 2019–2021 гг.

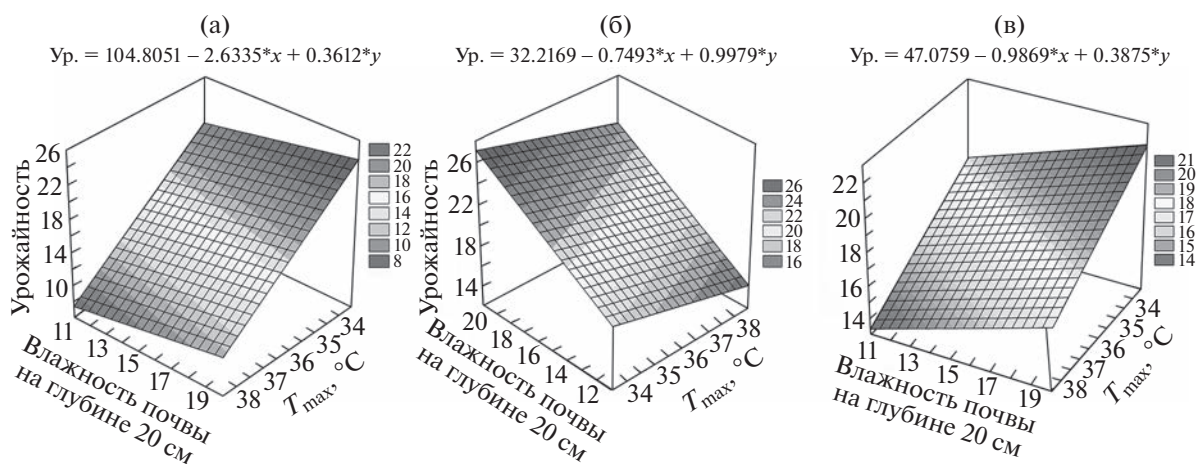
Сорт	Кол-во клубней на 1 растение			Средний вес клубней, г			Урожайность, т/г		
	2019	2020	2021	2019	2020	2021	2019	2020	2021
раннеспелые ($n = 5$)	5.0 ± 0.8	6.3 ± 1.1	7.0 ± 0.8	108.9 ± 16.1	74.2 ± 15.3	54.8 ± 12.0	21.2 ± 2.7	21.8 ± 3.7	18.4 ± 4.8
среднеранние ($n = 10$)	6.8 ± 2.0	6.5 ± 0.5	6.7 ± 2.0	96.8 ± 13.6	70.3 ± 9.3	48.2 ± 9.5	25.7 ± 6.1	20.8 ± 3.2	14.6 ± 4.4
среднеспелые ($n = 9$)	5.7 ± 1.9	6.7 ± 1.5	7.1 ± 0.9	89.4 ± 6.1	59.8 ± 7.0	43.7 ± 11.5	20.9 ± 7.9	19.0 ± 3.7	14.2 ± 4.1

ации температуры. Противоположное направление угла наклона плоскости в 3D модели среднеранних сортов в сравнении с раннеспелыми и среднеспелыми свидетельствует о том, что генотипы этой группы картофеля более чувствительны к содержанию влаги в почве и менее зависимы от температурных аномалий (рис. 2б). Так, больший угол образуется по осям, характеризующим содержание влаги в почве и урожайность, а меньший угол – по осям $T_{\max}$ и урожайность. Сорта среднеспелой группы по характеру зависимостей были похожи на группу раннеспелых сортов, однако влажность почвы оказывала большее влияние на их продуктивность в сравнении с раннеспелыми сортами (рис. 2в). Можно полагать, что в условиях Среднего Поволжья России раннеспелые отечественные сорта являются более адаптированными.

Урожайность клубней картофеля – сложный количественный признак, который зависит от ряда внешних и внутренних признаков [5, 14]. Оптимальной температурой для европейских сортов картофеля является 20°C , а каждое повышение на 5°C приводит к снижению скорости фотосинтеза и снижению урожайности примерно на 25%, а

при 35°C – на 30%. В регионе Средней Волги интервал средних температур составлял $25.5\text{--}32^{\circ}\text{C}$, а максимальных – $31\text{--}38^{\circ}\text{C}$. Эти условия приводили к дефициту влаги в почве, но не вызывали гибели растений, а существенно снижали массу клубней. Подобные результаты были получены в полевых экспериментах других исследователей [6, 14].

Таким образом, при исследовании 24 сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) установлено снижение урожайности картофеля при увеличении температуры воздуха и снижении почвенной влаги. Потери урожая зависели от сроков созревания сорта. Получены экспериментальные модели зависимости урожайности сортов различной спелости, которые могут использоваться при выборе и прогнозе их урожайности в зависимости от погодных условий региона выращивания. Как видно, в целях увеличения продуктивности и повышения качества картофеля необходимо учитывать особенности климатических условий региона, в том числе температурных аномалий, и возделывать сорта различных групп спелости, которые могут проявить свои преимущества в тех или иных агроклиматических условиях разных лет.

**Рис. 2.** Линейные поверхности распределения параметров урожайности раннеспелых (а), среднеранних (б) и среднеспелых (в) сортов картофеля в пространстве гидротермических факторов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр картофеля им. А.Г. Лорха” и создателям сортов *S. tuberosum* за предоставленный для исследований семенной материал.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Комплексного плана научных исследований “Развитие селекции и семеноводства картофеля” и “Структура, динамика и устойчивое развитие экосистем Волжского бассейна № 1021060107217-0-1.6.19”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. George T.S., Taylor M.A., Dodd I.C., White P.J. // Potato Res. 2018.
2. Cabello R., Monneveux P., De Mendiburu F., Bonierbale M. // Euphytica. 2013. V. 193. P. 147–156.
3. Demirel U., Çalişkan S., Yavuz C., Tindaş İ., Polgar Z., Vaszily Z., Černák I., Çalişkan M.E. // Turkish J. Agr. For. 2017. V. 41. P. 218–232.
4. Schafleitner R., Gutierrez R., Espino R., Gaudin A., Pérez J., Martínez M., Bonierbale M. // Potato Res. 2007. V. 50. P. 71–85.
5. Burton W.G. // Am. Potato J. 1981. V. 58. P. 3–14.
6. Ahn Y.J., Claussen K., Zimmerman J.L. // Plant Sci. 2004. V. 166. P. 901–911.
7. Wahid A., Gelani S., Ashraf M., Foolad M.R. // Environ. Exp. Bot. 2007. V. 61. P. 199–22.
8. Tang R., Niu S., Zhang G., Chen G., Haroon M., Yang Q., Rajora O.P., Li X.-Q. // Botany. 2018. V. 96. P. 897–912.
9. Monneveux P., Ramírez D.A., Pino M.-T. // Plant Sci. 2013. V. 205–206. P. 76–86.
10. Zarzyńska R., Boguszevska-Mańkowska D., Nosalewicz A. // Plant Soil Environ. 2017. V. 63. P. 159–164.
11. Deblonde P.M.K., Ledent J.F. // Eur. J. Agron. 2001. V. 14. P. 31–41.
12. Kumar S., Asrey A., Mandal G. // Indian J. Agricul. Sci. 2007. V. 77. P. 366–368.
13. Eiasu B.K., Soundy P., Hammes P.S. // New Zeal. J. Crop. Horticult. Sci. 2007. V. 35 P. 25–31.
14. Aliche E.B., Oortwijn M., Theeuwens T.P.J.M., Bachem C.W.B., van Eck H.J., Visser R.G.F., van der Linden C. // Euphytica. 2019. V. 215. P. 186.
15. Rozentsvet O.A., Bogdanova E.S., Nesterov V.N., Shevchenko S.N., Bakunov A.L., Milekhin A.V., Rubtsov S.L. // Doklady Biol. Sci. 2021. V. 497. P. 143–147.

PROGNOSTIC OF YIELD OF POTATOES OF PROMISING DOMESTIC VARIETIES UNDER THE IMPACT OF STRESS ABIOTIC FACTORS

O. A. Rozentsvet^a, E. S. Bogdanova^{a, #}, V. N. Nesterov^a, A. L. Bakunov^b, A. V. Milekhin^b, S. L. Rubtsov^b, N. N. Dmitrieva^b, and Academician of the RAS S. N. Shevchenko^c

^a Samara Federal Research Scientific Center RAS, Institute of Ecology of the Volga River Basin RAS, Togliatti, Russian Federation

^b Samara Federal Research Scientific Center RAS, Samara Scientific Research Agriculture Institute Named after N.M. Tulajkov, Bezenchuk, Russian Federation

^c Samara Federal Research Scientific Center RAS, Samara, Russian Federation

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

Twenty four potato varieties (*Solanum tuberosum* L.) differing in ripening groups (early, middle-early and mid-season-ripening) were studied. Potatoes were grown in the conditions of the Middle Volga region of Russia. It was found statistically that the yield (t/ha) of early and mid-season-ripening varieties was negatively correlated with the increase in average temperatures during the growing season from May to August ($R = -0.97$, $P = 0.04$). Soil moisture content at a depth of 20 cm was positively correlated with the yield of middle-early varieties ($R = 0.97$, $P = 0.04$). A soil moisture content increase was beneficial to average tuber weight ($R = 0.98$, $P = 0.04$), but only in the middle-early and mid-season-ripening groups. However, the soil moisture content and the tuber numbers in mid-season-ripening varieties had a negative correlation ($R = -0.96$, $P = 0.05$).

Keywords: *Solanum tuberosum* L., abiotic factors, productivity

УДК 577.214.5:575.174.015.3

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ДИВЕРСИФИКАЦИЯ КАРОТИНОИД-ЦИС-ТРАНС-ИЗОМЕРАЗ CrtISO, CrtISO-L1 И CrtISO-L2 У ВИДОВ ТОМАТА (*SOLANUM*, СЕКЦИЯ LYCOPERSICON)

© 2023 г. Г. И. Ефремов^{1,*}, А. В. Щенникова¹, Е. З. Кочиева¹

Представлено академиком РАН В.О. Поповым

Поступило 13.09.2022 г.

После доработки 05.10.2022 г.

Принято к публикации 06.10.2022 г.

Исследована экспрессия генов каротиноид-цис-транс-изомераз *CrtISO*, *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* в сравнении с содержанием каротиноидов у видов томата с разной окраской спелого плода: зеленая (*Solanum habrochaites*), желтая (*S. cheesmaniae*) и красная (*S. pimpinellifolium* и *S. lycopersicum*). Показано более древнее происхождение *CrtISO-L2* по отношению к *CrtISO* и *CrtISO-L1*. Выявлено сходное содержание суммарных каротиноидов (листья) и β-каротина (спелые плоды) между образцами. В отличие от плодов *S. habrochaites* и *S. cheesmaniae*, красные плоды накапливали ликопин и в 20–30 раз больше суммарных каротиноидов. Самый высокий уровень транскриптов и в листьях, и в спелых плодах — у *CrtISO*. Гены *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* транскрибировались высоко в листьях и низко в плодах, за исключением высокой экспрессии *CrtISO-L2* в плодах *S. lycopersicum*. Зависимость содержания каротиноидов от уровня экспрессии генов в плоде отсутствовала. В листьях показана положительная корреляция суммы каротиноидов с уровнем транскриптов *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2*.

Ключевые слова: виды томата, *Solanum*, каротиногенез, каротиноид-цис-транс-изомеразы, эволюция окраски плода томата

DOI: 10.31857/S2686738922600686, EDN: MOKOFP

ВВЕДЕНИЕ

Каротиноиды являются вторичными метаболитами и объединяют более 700 соединений с разнообразными биологическими функциями, касающимися взаимодействия организма с окружающей средой [1]. Их возникновение связывают с археями и бактериями, где каротиноиды играют роль стабилизаторов клеточных мембран [1].

У растений синтез каротиноидов происходит во всех тканях. Высокий восстановительный потенциал данных соединений, связанный с линейной системой сопряженных двойных связей C=C, делает их сильными антиоксидантами и участниками стрессового ответа. В фотосинтезирующей ткани они вносят значимый вклад в защиту фотосинтетического аппарата. В запасующих тканях каротиноиды определяют пигментацию, что важно с точки зрения опыления (цветки) и распространения семян (плоды) [1–4].

Биосинтез каротиноидов начинается с образования 15-цис-фитоина, который в несколько этапов преобразуется в полностью-транс-ликопин, являющийся субстратом для двух метаболических потоков β→β и β→ε с образованием полностью-транс-α-,β-каротинов и ксантофиллов. Цепочка реакций сопровождается цис-транс-изомерией системы сопряженных двойных связей. Так, цис-ликопин преобразуется в транс-ликопин под воздействием каротиноид-цис-транс-изомеразы CrtISO [5, 6].

Ген *CrtISO* (Solyc10g081650) идентифицирован в геноме томата *Solanum lycopersicum* L. при анализе мутации *tangerine*, при которой красная окраска спелого плода становится оранжевой [7]. Позднее в геноме томата найдены еще два гомолога *CrtISO*, аннотированные как *CrtISO-like 1* (*CrtISO-L1*; Solyc05g010180.2) и *CrtISO-L2* (Solyc07g021640) [2, 3].

S. lycopersicum входит в секцию *Lycopersicon*, состоящую из 12 видов томата, окраска спелого плода которых ассоциирована с эволюционным возрастом — от зеленой (древние виды) до желто-оранжево-красной (молодые виды). Поэтому виды томата являются удачной моделью для изучения каротиногенеза [8].

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

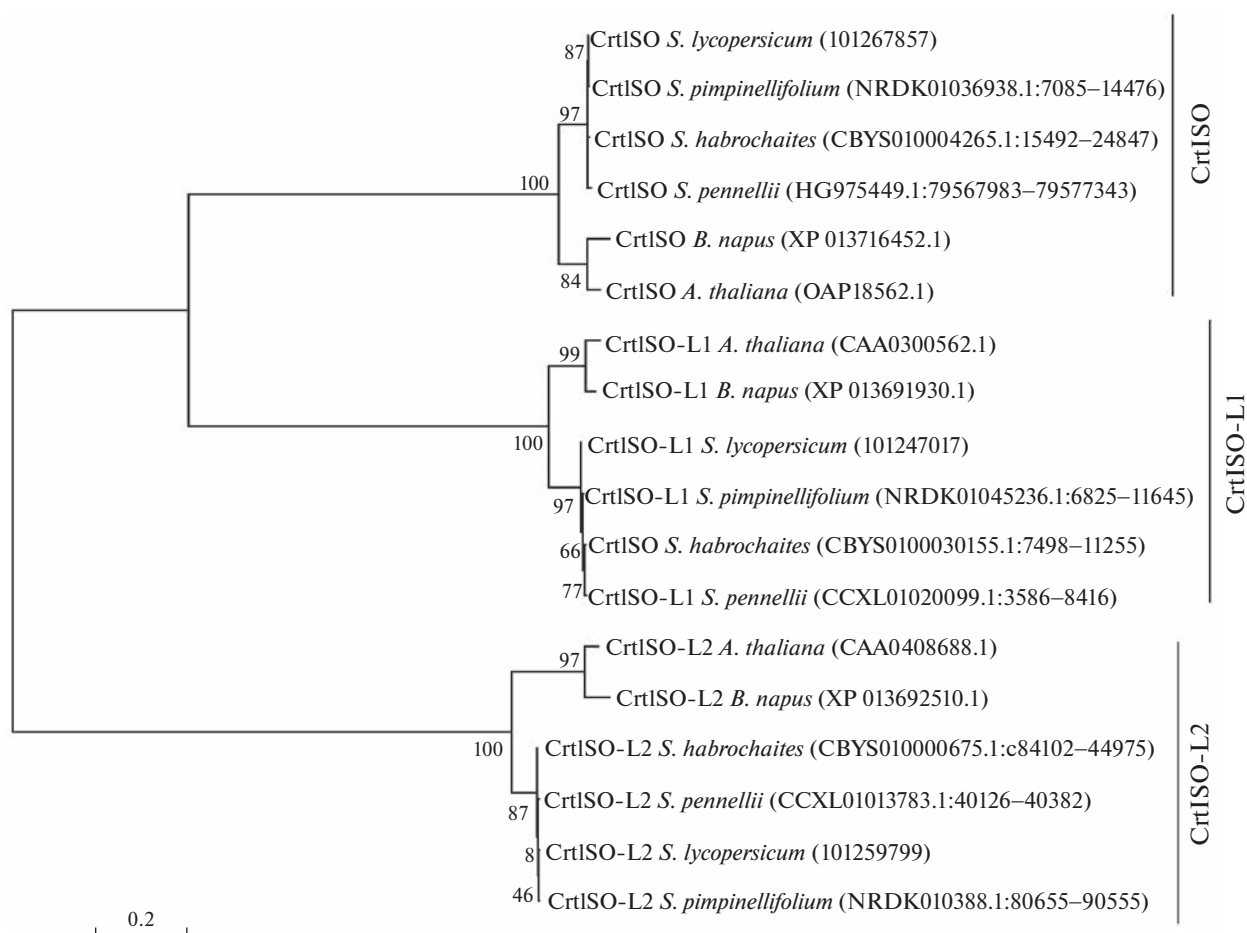


Рис. 1. Дендрограмма на основе аминокислотных последовательностей CrtISO, CrtISO-L1 и CrtISO-L2 *S. lycopersicum* (cv. Heinz), *S. pimpinellifolium* (LA0480), *S. pennellii* (LA0716), *S. habrochaites* (LA2144), *A. thaliana* и *Brassica napus*. Рядом с названиями белков — NCBI ID. Построено в MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>; метод Maximum Likelihood; 1000 бутстреп-реплик).

Целью данного исследования стала характеристика генов *CrtISO*, *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* у дикорастущих видов томата *S. habrochaites* (LA2144, зеленоплодный), *S. cheesmaniae* (LA0421, желтоплодный) и *S. pimpinellifolium* (LA0480, красноплодный) в сравнении с культивируемым видом *S. lycopersicum* (сорт Heinz, красноплодный).

Последовательности генов были найдены по гомологии с *CrtISO*, *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* *S. lycopersicum* в геномах видов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), за исключением *S. cheesmaniae*, и сравнены. Было обнаружено, что белки CrtISO содержат домен TIGR02730 (98–592 ак), характерный для каротин-изомераз, тогда как CrtISO-L1 и CrtISO-L2 — домен COG1233, специфичный для суперсемейства фитоин-дегидрогеназ. Однако все три типа последовательностей аннотированы как каротиноид-изомеразы — гомологи бактериальной фитоин-десатуразы CRTI, совмещающей функции десатурации и изомеризации [5, 9].

Предположительно сходная функция CrtISO, CrtISO-L1 и CrtISO-L2 в сочетании с низким сходством между ними (23–32%) может указывать их происхождение в результате давних дупликаций гена-предшественника. Филогенетический анализ, распределивший ортологи по трем кладам, показал, что клада CrtISO-L2 занимает базовое положение по отношению к сестринским кладам CrtISO и CrtISO-L1 (рис. 1). Это может свидетельствовать о более древнем происхождении CrtISO-L2, а также о сходстве функций CrtISO и CrtISO-L1. Наличие всех трех гомологов у *Arabidopsis thaliana* L. (рис. 1) позволяет предположить, что их возникновение предшествует расхождению высших растений на астериды и розиды.

Для уточнения функции *CrtISO*, *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* было определено содержание каротиноидов и профиль экспрессии генов в листьях и спелых плодах *S. habrochaites*, *S. cheesmaniae*, *S. pimpinellifolium* и *S. lycopersicum*.

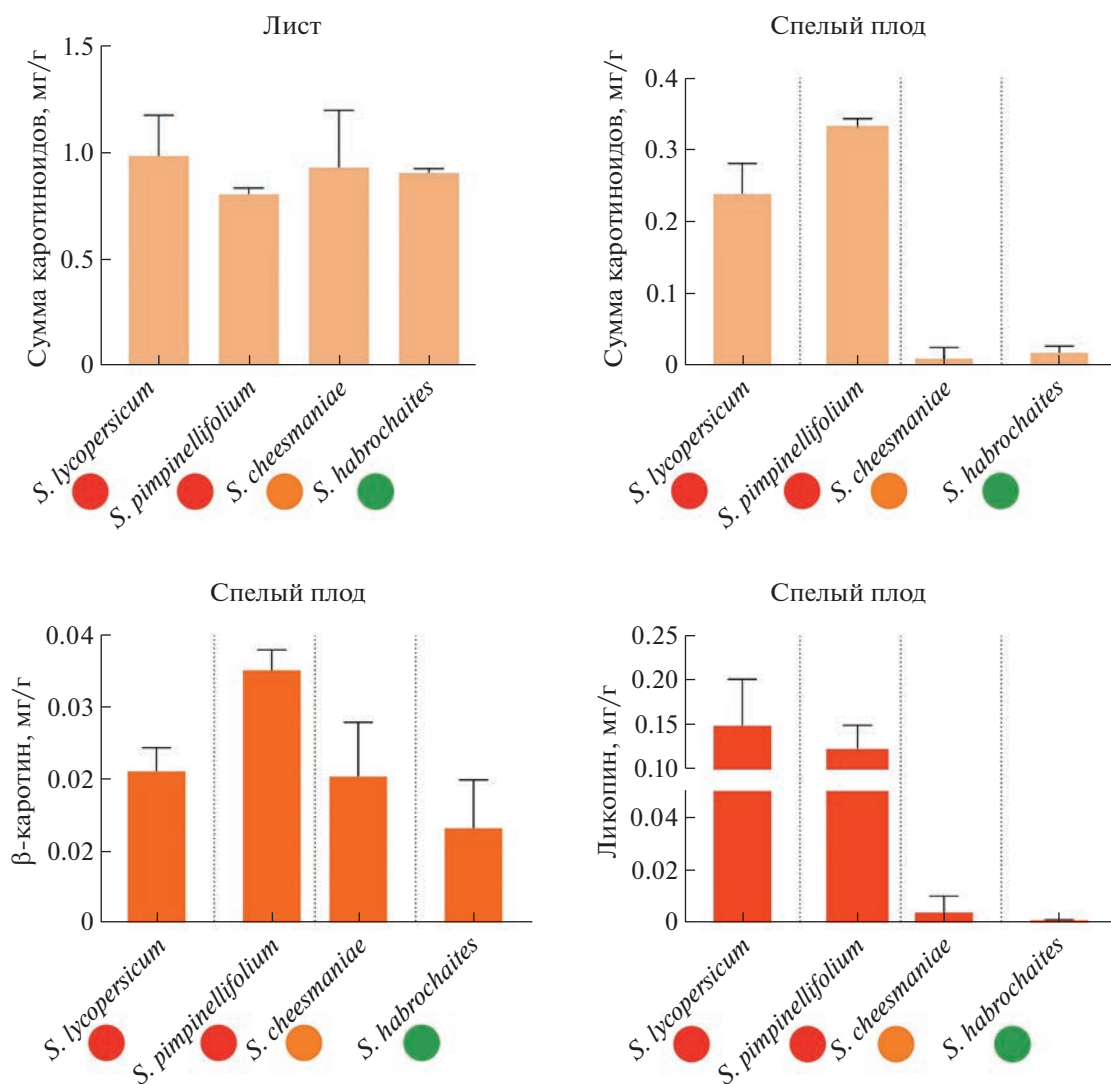


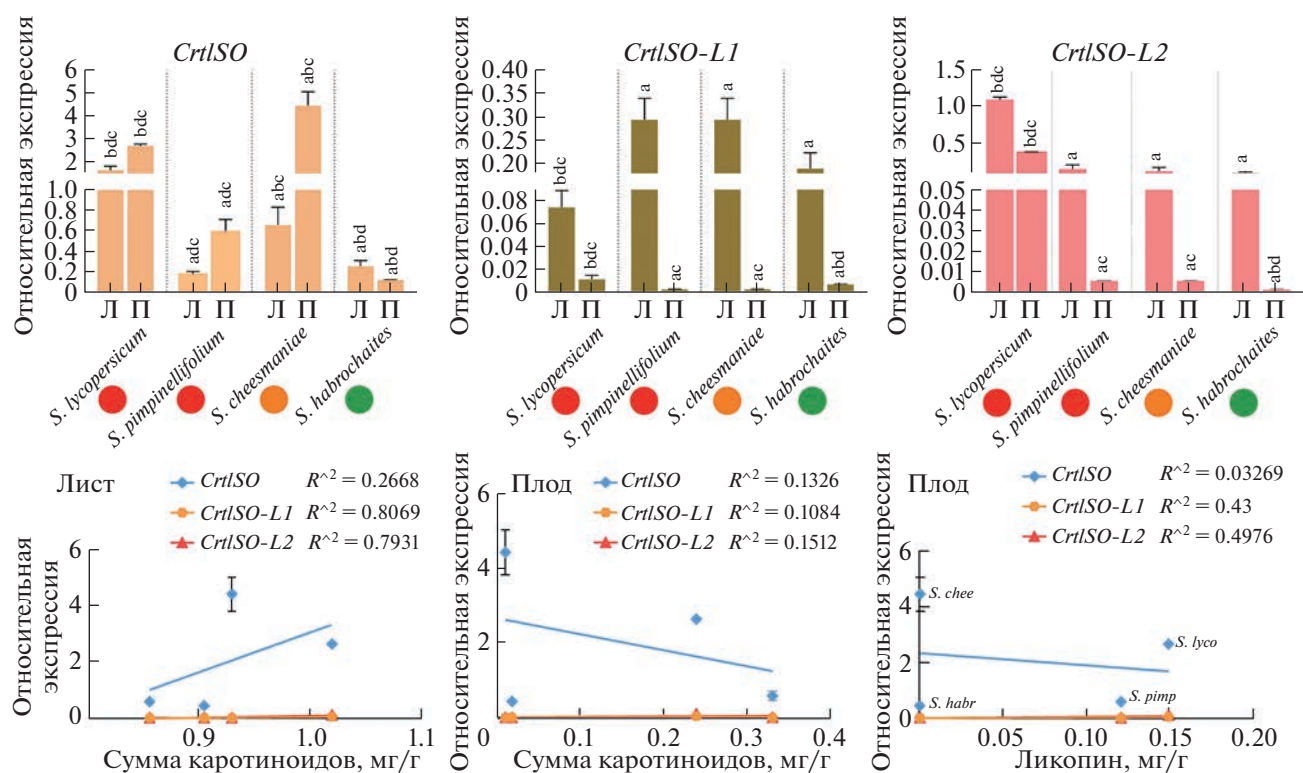
Рис. 2. Содержание (мг/г сырого веса) каротиноидов в листе (сумма каротиноидов) и спелом плоде (сумма каротиноидов, ликопин, β-каротин) *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae* и *S. habrochaites* (окраска спелого плода обозначена цветным кругом рядом с названием). Измерения проводили согласно [6].

Биохимический анализ показал отсутствие между образцами различий по сумме каротиноидов в листьях; в плодах их содержание было выше в 20–30 раз у красноплодных видов в сравнении с *S. cheesmaniae* и *S. habrochaites*. β-каротин в сходных количествах накапливали все плоды, а транс-ликопин — только красные (рис. 2).

Известно, что плод *S. lycopersicum* меняет окраску по мере созревания за счет того, что хлоропласты преобразуются в хромопласты, способные накапливать каротиноиды [10, 11]. Различная окраска плодов *S. cheesmaniae* и *S. habrochaites* при равном количестве β-каротина (рис. 2) может быть следствием нарушений в процессе формирования хромопластов у *S. habrochaites*, что было показано ранее [12]. С учетом сказанного, сходная сумма каротиноидов в листьях образцов

предполагает, что эволюция каротиногенеза у видов томата затронула только запасующие ткани, причем, в регуляции, скорее, идентичности пластид, чем пути биосинтеза каротиноидов.

Экспрессионный анализ обнаружил транскрипты трех генов в листьях и спелых плодах всех образцов. В плодах уровень транскриптов *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* был крайне низок (кроме высокого уровня *CrtISO-L2* у *S. lycopersicum*) в сравнении с *CrtISO*, который наиболее высоко экспрессировался у *S. cheesmaniae* (в ~1.8, 7.5 и 45 раз выше, чем у *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium* и *S. habrochaites*, соответственно) (рис. 3). Более высокий уровень транскриптов *CrtISO* по сравнению с *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* (рис. 3) согласуется с профилем экспрессии ортологических генов у *Citrus sinensis* [13], что подтверждает роль



CrtISO в каротиногенезе как в листьях, так и в плодах. Значительно большее количество транскриптов *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* в листьях по сравнению с плодами (рис. 3) предполагает преимущественное участие этих генов в биосинтезе каротиноидов в фотосинтезирующей ткани.

Оценка зависимости содержания каротиноидов от уровня экспрессии генов *CrtISO*, *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* не выявила такой взаимосвязи в спелом плоде (рис. 3), что было ранее продемонстрировано для *CrtISO* на выборке красноплодных сортов томата [6]. Однако в листьях были обнаружены положительные корреляции “сумма каротиноидов — уровень транскриптов *CrtISO-L1/CrtISO-L2*” (рис. 3).

Ранее на основании экспериментов по замалчиванию генов *CrtISO*, *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* томата было предположено участие *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* в биосинтезе полностью-*транс*- ζ -каротина — пути, конкурентного по отношению к синтезу полностью-*транс*-ликопина, с образованием неизвестных изопреноидов [5, 14]. Прямая зависимость суммы каротиноидов в листьях от уровня экспрессии *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* (рис. 3)

может свидетельствовать в пользу данного предположения.

Таким образом, у анализируемых видов томата содержание каротиноидов в спелом плоде соответствует его окраске, и равное содержание каротиноидов в листьях предполагает сходную скорость фотосинтеза. Ген *CrtISO* играет определяющую роль в биосинтезе каротиноидов как в плодах, так и в листьях. Гены *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* могут определять сдвиг биосинтеза каротиноидов в сторону полностью-*транс*- ζ -каротина и терпеноидов, являющихся промежуточными продуктами в биосинтезе различных жировых соединений, и, таким образом, сохраняют раннюю функцию каротиноид-изомераз в синтезе каротиноидов для клеточных мембран.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 19-16-00016, Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и с использованием экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sandmann G. // New Phytol. 2021. V. 232. P. 479–493.
2. Wei J., Xu M., Zhang D., et al. // Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). 2010. V. 42. P. 457.
3. Duduit J.R., Kosentka P.Z., Miller M.A., et al. // Hortic. Res. 2022. V. 9. Article uhac084.
4. Valenta K., Kalbitzer U., Razafimandimby D., et al. // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 14302.
5. Fantini E., Falcone G., Frusciante S., et al. // Plant Physiol. 2013. V. 163. P. 986.
6. Efremov G.I., Dzhos E.A., Ashikhmin A.A., et al. // Russ. J. Plant. Physiol. 2022. V. 69. P. 352–362.
7. Isaacson T., Ronen G., Zamir D., et al. // Plant Cell. 2002. V. 14. P. 333.
8. Peralta I.E., Spooner D.M., Knapp S. // Systematic Botany Monographs. 2008. V. 84. P. 1–186.
9. Sato S., Tabata S., Hirakawa H., et al. // Nature. 2012. V. 485. P. 635–641.
10. Osorio C.E. // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. Article 1235.
11. D'Andrea L., Rodriguez-Concepcion M. // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. Article 1071.
12. Kilambi H.V., Manda K., Rai A., et al. // J. Exp. Bot. 2017. V. 68. P. 4803–4819.
13. Pinheiro T.T., Peres L.E.P., Purgatto E., et al. // Plant Cell Rep. 2019. V. 38. P. 623.
14. Park H., Kreunen S.S., Cuttriss A.J., et al. // Plant Cell. 2002. V. 14. P. 321–332.

**FUNCTIONAL DIVERSIFICATION
OF THE CAROTENOID-*CIS-TRANS*-ISOMERASES *CrtISO*, *CrtISO-L1*,
AND *CrtISO-L2* IN TOMATO SPECIES
(*SOLANUM*, SECTION LYCOPERSICON)**

G. I. Efremov^{a,#}, A. V. Shchennikova^a, and E. Z. Kochieva^a

^a Federal State Institution “Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences”,
Moscow, Russian Federation

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

Presented by Academician of the RAS V.O. Popov

The expression of the genes of carotenoid-*cis-trans* isomerases *CrtISO*, *CrtISO-L1* and *CrtISO-L2* was studied in comparison with the content of carotenoids in tomato species with different ripe fruit colors: green (*Solanum habrochaites*), yellow (*S. cheesmaniae*) and red (*S. pimpinellifolium* and *S. lycopersicum*). More ancient origin of *CrtISO-L2* was shown in relation to *CrtISO* and *CrtISO-L1*. A similar content of total carotenoids (leaves) and β -carotene (ripe fruits) was found between the samples. Unlike fruits of *S. habrochaites* and *S. cheesmaniae*, red fruits accumulated lycopene and 20–30 times more total carotenoids. The highest level of transcripts both in leaves and in ripe fruits was detected for *CrtISO*. The *CrtISO-L1* and *CrtISO-L2* were transcribed high in leaves and low in fruits, except for the high expression of *CrtISO-L2* in *S. lycopersicum* fruits. No relationship was observed between the content of carotenoids and the level of gene expression in the fruit. In the leaves, a positive correlation between the amount of carotenoids and the levels of *CrtISO-L1* and *CrtISO-L2* transcripts was found.

Keywords: tomato species, *Solanum*, carotenogenesis, carotenoid-*cis-trans*-isomerase, evolution of tomato fruit color

УДК 612.834

НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЛОКОМОЦИИ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ИНСУЛЬТА

© 2023 г. Т. Р. Мошонкина^{1,*}, Е. Н. Жарова², С. С. Ананьев¹, Н. Д. Шандыбина¹,
Е. А. Вершинина¹, В. А. Ляховецкий¹, А. А. Гришин¹, академик РАН Е. В. Шляхто²,
член-корреспондент РАН Ю. П. Герасименко¹

Поступило 22.09.2022 г.
После доработки 03.10.2022 г.
Принято к публикации 09.10.2022 г.

Нейронные сети спинного мозга могут генерировать шагательный паттерн и контролировать позу в отсутствие супраспинальных влияний. Создана технология с использованием чрескожной электрической стимуляции спинного мозга (ЧЭССМ). Во время ходьбы ЧЭССМ активировала спинальные локомоторные сети, а также моторные пулы сгибателей/разгибателей ног в фазах переноса/опоры соответственно. Предположили, что применение этой технологии у людей с нарушениями локомоции улучшит ходьбу. Исследованы пациенты с гемипарезом через 3–11 мес после инсульта, длительность курса – 2 нед. Пациенты основной и контрольной групп получали стандартную терапию и реабилитацию с использованием технологии, в контрольной группе применяли фиктивную ЧЭССМ. После курса в основной группе, в отличие от контрольной, достигнуты минимальные клинически значимые изменения показателей ходьбы. Разработанная технология является эффективным средством восстановления ходьбы у пациентов с гемипарезом.

Ключевые слова: спинной мозг, электрическая стимуляция, моторный контроль, локомоция, двигательная реабилитация

DOI: 10.31857/S2686738922600601, **EDN:** MNUEOU

ВВЕДЕНИЕ

Нейронные сети спинного мозга (СМ) млекопитающих участвуют в регуляции постуральных и локомоторных функций, они могут генерировать шагательный паттерн в отсутствие супраспинальных влияний и периферических афферентных входов. Показано, что у людей с полным моторным параличом вследствие травмы СМ электрическая эпидуральная стимуляция СМ на поясничном уровне в сочетании с активацией афферентов может восстановить произвольные движения нижних конечностей и способность стоять без внешней поддержки [1]. Также было показано, что парализованные люди восстанавливали способность самостоятельно ходить с помощью эпидуральной стимуляции СМ на уровне сегментов L1–S1, зависимой от фаз шага [2].

Мы разработали спинальный нейропротез – технологию фазозависимой чрескожной элек-

трической стимуляции спинного мозга (ЧЭССМ) во время ходьбы, которая обеспечивает активацию локомоторных нейронных сетей СМ, а также моторных пулов сгибателей и разгибателей нижних конечностей в фазы переноса и опоры соответственно [3] (рис. 1, а).

Результаты исследований на здоровых добровольцах показали, что эта технология может быть использована для регуляции локомоции [4]. Описан клинический случай восстановления самостоятельной ходьбы у пациента с полным моторным параличом вследствие травмы СМ после реабилитации с использованием этой технологии [5].

Систематические исследования демонстрируют, что частота инсульта и смертность после инсульта во всем мире имеют тенденцию к снижению в последние десятилетия, при этом абсолютное число людей, пострадавших от инсульта и оставшихся инвалидами, увеличивается во всех возрастных группах [6]. Нарушение походки является одним из факторов ухудшения качества жизни пациентов после инсульта; двигательные нарушения приводят к увеличению риска падения, дополнительной инвалидизации, страху по-

¹ Институт физиологии им. И.П. Павлова
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр
имени В.А. Алмазова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: moshonkina@infran.ru

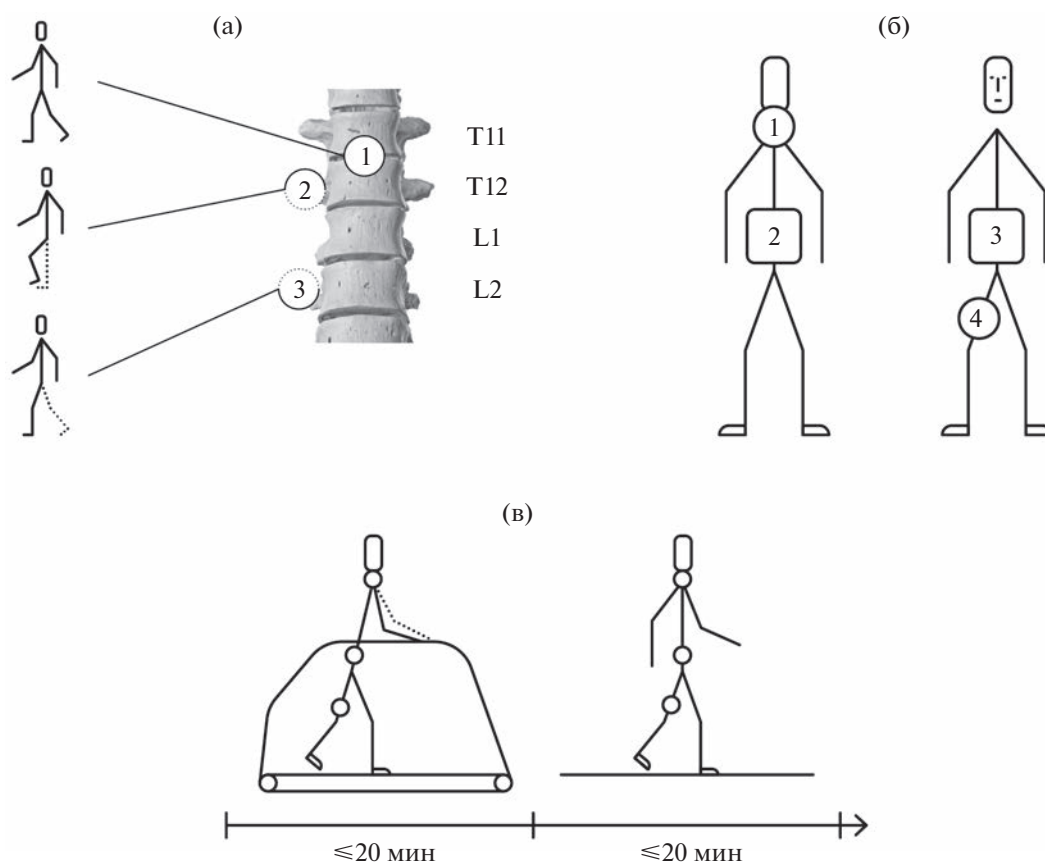


Рис. 1. (а) Принцип работы спинального нейропротеза, расположение катодов: 1 – ЧЭССМ по средней линии между позвонками T11–T12 во время ходьбы, 2 – стимуляция корешков СМ на стороне пареза на уровне T11 в фазе переноса ипсилатеральной ноги, 3 – стимуляция корешков СМ на стороне пареза на уровне L1 в фазе опоры ипсилатеральной ноги. (б) Расположение компонентов нейропротеза: 1 – катод между позвонками C5–C6, 2 – матрица электродов, показанных в части (а), 3 – стимулятор, 4 – датчик фаз шага. (в) Протокол реабилитационной процедуры.

тери равновесия и, в будущем, к социальной изоляции.

Цель работы – оценка эффективности спинального нейропротеза для регуляции ходьбы у пациентов с последствиями инсульта. Мы проверяли предположение о том, что применение спинального нейропротеза у людей с нарушениями локомоции после инсульта приведет к улучшению самостоятельной ходьбы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в Российском научно-исследовательском нейрохирургическом институте им. проф. А.Л. Поленова. В исследование включены пациенты, находившиеся в стационаре на реабилитации, перенесшие инсульт, верифицированный с помощью магнитно-резонансной или компьютерной томографии, в возрасте от 18 до 70 лет. Срок с момента инсульта 1–12 мес, клинические проявления инсульта в виде двигательных нарушений по типу гемипареза (2–4 балла), пациенты могли самостоятельно стоять и пройти

по полу не менее 10 м (с опорой на трость или ходунки при необходимости). Реабилитационный курс состоял из 12 процедур, ежедневно. Тестирования проводили за 1–2 дня до начала реабилитационных процедур и на следующий день после окончания реабилитационного курса.

Первичная точка эффективности: улучшение показателей ходьбы в тесте 10-метровой ходьбы и в тесте 6-минутной ходьбы.

Вторичные точки эффективности: улучшение показателей в тестах по шкалам Фугл-Майера, силы мышц Британского совета медицинских исследований (Harrison scale), количественной оценки мышечной силы (Medical Research Council Weakness Scale), Бепра (Berg Balance Scale), меры функциональной независимости, модифицированной шкале Ашворта, – а также по оценке пространственно-временных и кинематических параметров, полученным с применением биометрических сенсоров “Нейросенс” (ООО Нейрософт), по электрической активности мышц.

Таблица 1. Демографические и клинические параметры пациентов

Группа	N	Пол (М/Ж)	Возраст (лет)	Тип инсульта (иш/гем*)	Период после инсульта (мес)	Число пациентов с ТСП**
Основная	10	8/2	56.4 ± 9.0	9/1	7.1 ± 3.0	3
Контрольная	10	7/3	52.9 ± 10.8	8/2	6.9 ± 3.5	2

*Ишемический/геморрагический

**Технические средства реабилитации

Таблица 2. Результаты тестов 6-мин ходьбы и ходьбы на 10 м с комфортной скоростью

Группа	6 мин (м)		10 м (м/сек)	
	До	После	До	После
Основная	236.8 ± 70.7	293.4 ± 90.1	0.890 ± 0.097	1.001 ± 0.099
Контрольная	248.4 ± 87.8	266.3 ± 71.3	0.887 ± 0.097	0.883 ± 0.099

Спинальный нейропротез детектировал фазы шага и управлял ЧЭССМ так, что на стороне пареза в фазе переноса ноги активировали моторные пулы сгибателей этой ноги, а в фазе опоры — моторные пулы разгибателей (рис. 1а). Для того, чтобы увеличить возбудимость спинальных локомоторных сетей, проводили непрерывную ЧЭССМ в проекции поясничного и шейного утолщений СМ (рис. 1а, 1б). Для стимуляции на уровне позвонков С5–6 и Т11–12 использовали прямоугольные биполярные импульсы с частотой 30 Гц. При фазозависимой ЧЭССМ на уровне корешков Т11 и L1 — прямоугольные монополярные импульсы с частоты 30 Гц и 15 Гц соответственно. Все импульсы модулированы частотой 5 кГц. Стимулятор располагали на поясе на теле пациента, также в составе нейропротеза — датчик фаз шага, который фиксировали на бедре паретичной ноги (рис. 1б). Детально принцип работы спинального нейропротеза изложен в [7].

Интенсивность ЧЭССМ подбирали для каждого уровня стимуляции, ориентируясь на ответы пациента — ток должен был ощущаться, но не вызывать дискомфорт, не мешать ходьбе. Диапазон токов был 20–60 мА.

Реабилитационная процедура состояла из ходьбы со спинальным нейропротезом сначала по беговой дорожке, потом по полу (рис. 1в). Суммарная длительность ходьбы во время процедуры до 40 мин без учета перерывов на отдых.

Пациенты были распределены случайным образом на две группы, основную и контрольную (табл. 1). Все пациенты получали стандартную реабилитационную терапию по показаниям и реабилитацию с использованием нейропротеза. Пациенты контрольной группы на процедуре во время ходьбы получали фиктивную ЧЭССМ, при которой стимуляцию на каждом уровне начинали с ощутимой, заранее подобранной, интенсивно-

сти и уменьшали до 0 мА в течение 1 мин в соответствии с [8, 9].

Статистические характеристики представлены средними значениями, стандартными отклонениями и ошибками средних. Парные сравнения проводили с использованием ранговых критериев Вилкоксона и Манна–Уитни. Статистические решения принимались при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении пробы 6-минутной ходьбы перед пациентом ставят задачу пройти как можно большую дистанцию за 6 мин в собственном темпе. В начале исследования пройденные дистанции значимо не отличались между группами, после курса пациенты основной группы проходили дистанцию больше, чем пациенты контрольной группы (табл. 2). В основной группе увеличение дистанции составило 56.6 ± 11.9 м и значимо отличается от нуля ($p < 0.001$), в контрольной — 17.9 ± 11.9 м, изменение незначимое (рис. 2а).

Минимальный клинически значимый показатель (minimal clinically important difference — MCID) в тесте 6-минутной ходьбы у пациентов, перенесших инсульт 2–6 мес назад, составляет 44 м [10]. У пациентов основной группы увеличение дистанции больше MCID на ~30%, что демонстрирует эффективность исследуемой технологии.

При проведении теста ходьбы на 10 м определяют скорости, с которыми пациент проходит дистанцию в режиме комфортной и максимально быстрой ходьбы. В начале курса значения скорости комфортной ходьбы у основной и контрольной групп практически совпадали, после курса значение скорости в основной группе заметно увеличилось, в контрольной — не изменилось (табл. 2, рис. 2б). Увеличение скорости комфорт-

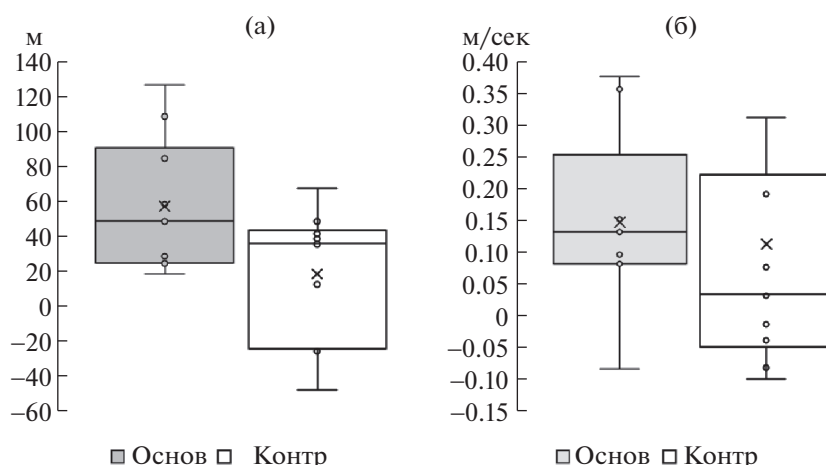


Рис. 2. Изменение после курса дистанции, пройденной в тесте 6-мин ходьбы (а), и скорости ходьбы в привычном темпе в тесте ходьбы на 10 м (б).

ной ходьбы в основной группе составило 0.118 ± 0.043 м/с, в контрольной — 0.004 ± 0.043 м/с. Прирост скорости в основной группе значимо отличался от нуля ($p = 0.013$). Изменения скорости максимально быстрой ходьбы в основной группе показали аналогичную тенденцию, но были не достоверны ($p = 0.119$).

Увеличение комфортной скорости в тесте ходьбы на 10 м более, чем на 0.1 м/с, является клинически значимым (MCID составляет 0.10–0.17 м/с для пациентов с инсультом) [11]. Такое увеличение получено у пациентов основной группы.

По результатам остальных 6 из 7 неврологических тестов и физиологических исследований в основной группе получены статистически значимые улучшения показателей. В контрольной группе статистически значимые улучшения показателей получены в 4 тестах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технология спинального нейропротеза основана на результатах фундаментальных исследований механизмов регуляции постуральных и локомоторных функций. Уникальность технологии заключается в ритмической активации сгибаемых/разгибаемых моторных пулов нижних конечностей в определенные фазы шагательного цикла в сочетании с непрерывной стимуляцией локомоторных нейронных сетей. Полученные данные свидетельствуют о том, что при использовании нейропротеза в реабилитации для достижения минимальных клинически значимых изменений показателей ходьбы достаточно двухнедельного курса. Это дает основание заключить, что новая технология является эффективным средством восстановления ходьбы у пациентов с ге-

мипарезом в раннем и позднем восстановительном периоде после инсульта.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Фонд поддержки проектов Национальной технической инициативы, договор № 33/19гр от 21.11.2019. Государственная программа фундаментальных исследований, тема № 0113-2019-0006 (63.4.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

У авторов отсутствуют потенциальные и явные конфликты интересов, связанные с рукописью.

Клиническое исследование одобрено на заседании Совета по этике в сфере обращения медицинских изделий Министерства здравоохранения (протокол № 40 от 07.02.2022). Использован “Аппарат для нейростимуляции “Спинальный нейропротез” в вариантах исполнения” по ТУ 26.60.13-004-65248030-2021 (ООО “Косима”).

Все участники исследования подписали информированное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Angeli C., Edgerton V., Gerasimenko Y., et al. Altering spinal cord excitability enables voluntary movements after chronic complete paralysis in humans // *Brain*. 2014. V. 137. P. 1394–1409.
2. Wagner F., Mignardot J., Le Goff-Mignardot C., et al. Targeted neurotechnology restores walking in humans with spinal cord injury // *Nature*. 2018. V. 563. P. 65–71.
3. Moshonkina T., Grishin A., Bogacheva I., et al. Novel non-invasive strategy for spinal neuromodulation to control human locomotion // *Front. Hum. Neurosci.* 2021. V. 14. P. 622533.

4. Gorodnichev R., Pukhov A., Moiseev S., et al. Regulation of gait cycle phases during noninvasive electrical stimulation of the spinal cord // *Hum. Physiol.* 2021. V. 47. P. 60–69.
5. Siu R., Brown E., Mesbah S., et al. Novel noninvasive spinal neuromodulation strategy facilitates recovery of stepping after motor complete paraplegia // *J. Clin. Med.* 2022. V. 11. P. 3670.
6. Feigin V., Norrving B., Mensah G. Global burden of stroke // 2017. *Circ. Res.* V. 120. P. 439–448.
7. Grishin A., Bobrova E., Reshetnikova V., et al. A system for detecting stepping cycle phases and spinal cord stimulation as a tool for controlling human locomotion // *Biomed. Eng.* 2021. V. 54. P. 312–316.
8. Murray L., Tahayori B., Knikou M. Transspinal direct current stimulation produces persistent plasticity in human motor pathways // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 1–11.
9. Benavides F., Jo H., Lundell H., et al. Cortical and subcortical effects of transcutaneous spinal cord stimulation in humans with tetraplegia // *J. Neurosci.* 2020. V. 40. P. 2633–2643.
10. Fulk G., He Y. Minimal clinically important difference of the 6-minute walk test in people with stroke // *J. Neurol. Phys. Ther.* 2018. V. 42. P. 235–240.
11. Bohannon R., Glenney S. Minimal clinically important difference for change in comfortable gait speed of adults with pathology: a systematic review // *J. Eval. Clin. Pract.* 2014. V. 20. P. 295–300.

A NEW TECHNOLOGY FOR RECOVERY OF LOCOMOTION IN PATIENTS AFTER A STROKE

**T. R. Moshonkina^{a, #}, E. N. Zharova^b, S. S. Ananov^a, N. D. Shanybina^a,
E. A. Vershinina^a, V. A. Lyakhovetskii^a, A. A. Grishin^a, Academician of the RAS E. V. Shlyakhto^b,
and Corresponding Member of the RAS Y. P. Gerasimenko^a**

^a *Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation*

^b *Almazov National Medical Research Centre, Saint- Petersburg, Russian Federation*

[#] *e-mail: moshonkina@infran.ru*

Neural networks in the spinal cord can generate the walking pattern and control posture in the absence of supraspinal influences. A technology has been created using transcutaneous electrical spinal cord stimulation (tSCS). During walking, tSCS activated spinal locomotor networks, as well as leg flexor/extensor motor pools in the swing/support phases, respectively. It was suggested that the use of this technology in people with locomotion disorders would improve walking. Patients with hemiparesis were studied 3–11 months after a stroke, the duration of the course was 2 weeks. Patients of the main and control groups received standard therapy and rehabilitation using technology; in the control group, sham tESCS was used. After the course in the main group, in contrast to the control group, minimal clinically significant changes in walking parameters were achieved. The developed technology is an effective means of restoring walking in patients with hemiparesis.

Keywords: spinal cord, electrical stimulation, motor control, locomotion, motor rehabilitation

УДК 577.152.421+577.175.534:597.2/.5(98)

УРОВЕНЬ КОРТИЗОЛА И АКТИВНОСТЬ Na^+/K^+ -АТФАЗЫ В ПРОЦЕССЕ РОСТА И РАЗВИТИЯ МОЛОДИ ЛЕПТОКЛИНА ПЯТНИСТОГО *LEPTOCLINUS MACULATUS* (FRIES, 1838) В АРКТИКЕ

© 2023 г. Н. Л. Рендаков^{1,*}, Е. И. Кяйвяряйнен¹, С. Н. Пеккоева¹,
С. А. Мурзина¹, К. М. Никерова²

Представлено академиком РАН Н.Н. Немовой

Поступило 01.09.2022 г.

После доработки 20.09.2022 г.

Принято к публикации 22.09.2022 г.

Исследована динамика уровня кортизола и активности Na^+/K^+ -АТФазы (НКА), связанных с поддержанием ионного гомеостаза клеток, в скелетных мышцах молоди циркумполярной рыбы лептоклина пятнистого *Leptoclinus maculatus* (Fries, 1838), экологически значимого представителя ихтиофауны арктического архипелага Шпицберген. Установлено, что уровень кортизола и активность НКА снижаются в процессе развития молоди лептоклина от пелагической молоди стадии L2 к стадии L5, ведущей в основном придонный образ жизни. Полученные результаты позволяют предположить, что кортизол может участвовать в регуляции активности одного из основных осморегуляторных факторов — НКА. Это может иметь значение для роста и адаптации пелагической молоди лептоклина пятнистого к придонной среде обитания в процессе постэмбрионального развития в Арктике.

Ключевые слова: кортизол, Na^+/K^+ -АТФаза, *Leptoclinus maculatus*, онтогенез, Арктика

DOI: 10.31857/S2686738922600698, **EDN:** MONCJB

ВВЕДЕНИЕ

Лептоклин пятнистый (*Leptoclinus maculatus* Fries, 1838, семейство Стихеевые), встречается на глубинах от 2 до 488 м и является представителем костистых рыб, предпочитающим биотопы с повышенной соленостью [1]. Он широко распространен в морских экосистемах Арктики и Северной Атлантики [2, 3]. В постэмбриональном развитии *L. maculatus* выделяют несколько последовательно сменяющих друг друга стадий развития — от стадии L1 до L5 (ранняя ювенильная стадия). Зимний количественный учет в акватории Конгсфьорда (арх. Шпицберген) позволил выявить пелагическую (стадии L2 и L3) и придон-

ную (стадия L5) экологические группы молоди *L. maculatus* [4]. В процессе длительного развития лептоклина происходит ряд морфологических и физиолого-биохимических изменений, и к стадии L5 (2–5 лет) *L. maculatus* начинает вести преимущественно придонный образ жизни [2, 4, 5].

В регуляции широкого спектра физиологических процессов (промежуточный метаболизм, рост, осморегуляция) и поведения принимает участие стероидный гормон кортизол [6]. В организме костистых рыб, в отличие от наземных позвоночных, кортизол выполняет не только глюкокортикоидные, но и минералокортикоидные функции [7].

Na^+/K^+ -АТФаза (НКА) — мембранный фермент, осуществляющий активный транспорт ионов и экспрессирующийся во всех органах, в том числе в осморегуляторных [8] и в мышцах [9]. Имеется достаточно много работ о влиянии кортизола на активность НКА в жабрах взрослых костистых рыб [10]. При этом проблема регуляции ионного обмена в тканях рыб на ранних стадиях развития изучена недостаточно [11]. S. Varsamos и соавт. [12] показали, что активность НКА в тканях лаврака обыкновенного (*Dicentrarchus labrax*) наблюдается на ранних стадиях постэмбрионального развития.

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

² Институт леса — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”, Петрозаводск, Россия

*e-mail: nlrend@mail.ru

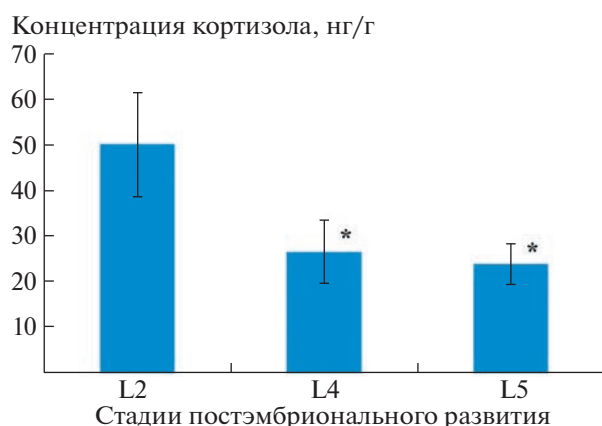


Рис. 1. Концентрация кортизола у молоди *L. maculatus*.

Примечание: * — различия достоверны по сравнению со стадией L2 при $p < 0.05$.

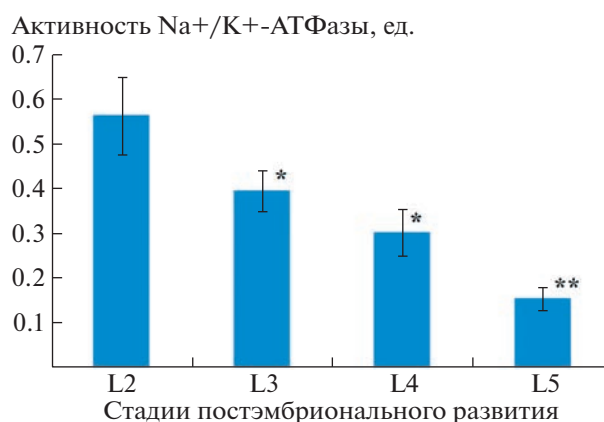


Рис. 2. Активность NKA в мышцах *L. maculatus* на стадиях развития L2–L5.

Примечание: * — различия достоверны по сравнению со стадией L2 при уровне значимости $p < 0.05$, ** — при уровне значимости $p < 0.01$.

В данной работе впервые исследовали динамику уровня кортизола и активности NKA в скелетных мышцах *L. maculatus* в онтогенезе (от пелагической стадии развития L2 до придонной стадии L5).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Молодь *L. maculatus* была собрана в ходе экспедиции на судне “Helmer Hanssen” (Норвегия, UiT) в акватории о. Западный Шпицберген в заливе Исфьорд. Как только биоматериал был извлечен из орудия лова, его подвергали глубокой заморозке (-80°C) и транспортировали для анализа в лабораторию. Стадии развития молоди определяли по классификации С. Meyer Ottesen и соавт. [2, 4]. Биохимические показатели определяли в дорсальной области больших продольных мышц.

Концентрацию кортизола определяли методом масс-спектрометрии по методике, описанной нами ранее [13]. Активность NKA определяли спектрофотометрически [13, 14]. Анализ уровня кортизола проведен на стадиях развития L2, L4, L5, активность NKA измеряли на стадиях L2–L5. Исследовали по 5–6 особей каждой стадии. Различия между стадиями развития по исследуемым биохимическим показателям оценивали с использованием непараметрического критерия Уилкоксона–Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание кортизола в мышцах *L. maculatus* на стадии L2 составило 50.14 ± 10.20 нг/г и было вдвое выше ($p < 0.05$), чем у особей на стадиях L4 и L5 (рис. 1). Активность NKA в мышцах по мере

развития от пелагических особей (L2–L4) к особям стадии L5 значительно снижается (рис. 2).

Высокие значения уровня кортизола в мышцах *L. maculatus* на стадии L2 (относительно последующих стадий развития) могут свидетельствовать о повышенной активности интерренальной ткани в возрасте 1–2 лет. У японской камбалы (*Paralichthys olivaceus*) на личиночной стадии развития уровень кортизола достигает пика во время метаморфоза — примерно через месяц после вылупления [15].

Выявленные нами изменения уровня кортизола (рис. 1) могут быть связаны с различной скоростью роста *L. maculatus* и соответствующими метаболическими изменениями. От стадии L2 до стадии L4 у молоди лептоклина наблюдается усиленный рост [2, 4]. Известно, что личинки лептоклина со стадии L2 начинают питаться высококалорийным зоопланктоном рода *Calanus* [4, 5] и могут использовать продукты расщепления полученных с пищей липидов на процессы роста и развития. Показано, что запуск биосинтеза кортизола при переходе рыб на экзогенное питание может иметь большое значение для ассимиляции белков и углеводов пищи с целью обеспечения энергетических и ростовых процессов [16]. Известно, что повышенный уровень кортизола приводит к торможению роста рыб, что позволяет предположить наличие обратной зависимости между скоростью роста и уровнем кортизола [17].

Максимальная активность NKA на стадии L2 и последующее снижение ее уровня свидетельствуют о сходе динамики этого показателя с таковой кортизола при развитии лептоклина до стадии L5. Возможно, что влияние кортизола на рост опосредуется его воздействием на активность NKA. Известно, что высокие дозы глюко-

кортикоидов стимулируют синтез НКА в скелетных мышцах [18]. Кроме того, кортизол участвует в осморегуляторных процессах при изменении солености среды и вызывает увеличение активности НКА в органах и тканях рыб [10, 12, 13]. Снижение активности НКА у рыб может приводить к сокращению энергетических расходов на процессы осморегуляции, что в свою очередь способствует ускорению роста [19].

Таким образом, установлена динамика понижения уровня глюкокортикоидного гормона кортизола и активности НКА в процессе развития лептоклина от стадии L2 к стадии L5. По-видимому, снижение уровня кортизола и активности НКА может способствовать усилению роста молоди *L. maculatus* и, в дальнейшем, адаптации к придонному образу жизни в условиях Арктики.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено на оборудовании Центра коллективного пользования КарНЦ РАН.

Исследование финансировалось из средств государственного бюджета по ГЗ КарНЦ РАН FMEN-2022-0006.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мурзина С.А. Роль липидов и их жирнокислотных компонентов в эколого-биохимических адаптациях рыб северных морей. Дис. ... докт. биол. наук. Москва, 2019. Специальности 03.02.06 – “ихтиология” и 03.01.04. – “биохимия”. Дата защиты: 23.10.2019, дата утверждения: 27.02.2020. 376 с.
2. Meyer Ottesen C.A., Hop H., Christiansen J.S., et al. Early life history of the daubed shanny (Teleostei: *Leptoclinus maculatus*) in Svalbard waters // Mar. Biodivers. 2011. Vol. 41. № 3. P. 383–394.
3. Андрияшев А.П. Рыбы северных морей СССР. Москва, Ленинград: Издательство Академии наук СССР, 1954. 566 с.
4. Pekkoeva S.N., Murzina S.A., Ieshko E.P., et al. Ecological groups of the daubed shanny *Leptoclinus maculatus* (Fries, 1838), an Arcto-boreal species, regarding growth and early development // Russ. J. Ecol. 2018. V. 49. № 3. P. 253–259.
5. Murzina S.A., Pekkoeva S.N., Kondakova E.A., et al. Tiny but fatty: lipids and fatty acids in the daubed shanny (*Leptoclinus maculatus*), a small fish in Svalbard waters // Biomolecules. 2020. V. 10. № 3. P. 368.
6. Das C., Thraya M., Vijayan M.M. Nongenomic cortisol signaling in fish // Gen. Comp. Endocrinol. 2018. V. 265. P. 121–127.
7. Рендаков Н.Л. Некоторые аспекты стероидной регуляции у костистых рыб // Труды Карельского научного центра Российской академии наук. 2018. № 6. P. 3–21.
8. Zhu H., Liu Z., Gao F., et al. Characterization and expression of Na^+/K^+ -ATPase in gills and kidneys of the Teleost fish *Oreochromis mossambicus*, *Oreochromis urolepis hornorum* and their hybrids in response to salinity challenge // Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol. 2018. V. 224. P. 1–10.
9. Doğanlı C., Kjaer-Sorensen K., Knoeckel C., et al. The $\alpha 2\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase is critical for skeletal and heart muscle function in zebrafish // J. Cell Sci. 2012. V. 125. № Pt 24. P. 6166–6175.
10. Takei Y., McCormick S.D. Hormonal control of fish euryhalinity // Euryhaline Fishes. Elsevier: Academic Press, 2013. P. 69–123.
11. Schreiber A.M. Metamorphosis and early larval development of the flatfishes (Pleuronectiformes): an osmoregulatory perspective // Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol. 2001. V. 129. № 2–3. P. 587–595.
12. Varsamos S., Nebel C., Charmantier G. Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: A review // Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol. 2005. V. 141. № 4. P. 401–429.
13. Nemova N.N., Kaivarainen E.I., Rendakov N.L., et al. Cortisol content and Na^+/K^+ -ATPase activity under adaptation of juvenile pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* (Salmonidae) to salinity changes // J. Ichthyol. 2021. V. 61. № 5. P. 771–778.
14. Елаев Н.Р., Семенов Е.В. Изменение активности мембранных АТФаз мозга при воздействии холино- и адреномиметических веществ // Биохимия. 1974. V. 39. № 3. P. 636–640.
15. de Jesus E.G., Hirano T., Inui Y. Changes in cortisol and thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* // Gen. Comp. Endocrinol. 1991. V. 82. № 3. P. 369–376.
16. Pavlidis M., Karantzali E., Fanouraki E., et al. Onset of the primary stress in European sea bass *Dicentrarchus labrax*, as indicated by whole body cortisol in relation to glucocorticoid receptor during early development // Aquaculture. 2011. V. 315. № 1–2. P. 125–130.
17. DiBattista J.D., Levesque H.M., Moon T.W., et al. Growth depression in socially subordinate rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: more than a fasting effect // Physiol. Biochem. Zool. 2006. V. 79. № 4. P. 675–687.
18. Pirkmajer S., Chibalin A.V. Na^+/K^+ -ATPase regulation in skeletal muscle // Am. J. Physiol. Metab. 2016. V. 311. № 1. P. E1–E31.
19. Imsland A.K., Gunnarsson S., Foss A., et al. Gill Na^+/K^+ -ATPase activity, plasma chloride and osmolality in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) reared at different temperatures and salinities // Aquaculture. 2003. V. 218. № 1–4. P. 671–683.

**CORTISOL LEVEL AND Na^+/K^+ -ATPASE ACTIVITY DURING GROWTH
AND DEVELOPMENT OF JUVENILE DAUBED SHANNY
LEPTOCLINUS MACULATUS (FRIES, 1838) IN THE ARCTIC**

N. L. Rendakov^{a, #}, E. I. Kaivarainen^a, S. N. Pekkoeva^a, S. A. Murzina^a, and K. M. Nikerova^b

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

^b *Forest Research Institute of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
Petrozavodsk, Russian Federation*

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

The dynamics of cortisol level and Na^+/K^+ -ATPase (NKA) activity that are associated with the maintenance of cell ion homeostasis was studied in skeletal muscles of juvenile circumpolar fish daubed shanny *Leptoclinus maculatus* (Fries, 1838), an ecologically significant representative of the ichthyofauna of the Arctic Svalbard archipelago. It has been established that the level of cortisol and NKA activity decrease during the development of daubed shanny juveniles from L2 stage pelagic juveniles of L5 stage, which are mainly demersal. The results obtained suggest that cortisol may be involved in the regulation of the activity of one of the main osmoregulatory factors, NKA. This may be important for the growth and adaptation of pelagic juveniles of daubed shanny to the demersal habitat during postembryonic development in the Arctic.

Keywords: cortisol, Na^+/K^+ -ATPase, *Leptoclinus maculatus*, ontogeny, Arctic

УДК 546.100.02.3:547.15/17

СИНТЕЗ МЕЧЕННОГО ДЕЙТЕРИЕМ ПИРРОЛИЛКАРНОЗИНА

© 2023 г. В. П. Шевченко^{1,*}, И. Ю. Нагаев¹, Т. Н. Федорова², академик РАН Н. Ф. Мясоедов¹

Поступило 25.09.2022 г.

После доработки 15.10.2022 г.

Принято к публикации 15.10.2022 г.

Изучено влияние температуры на эффективность введения дейтерия в пирролилкарнозин (ПК). В качестве источника дейтерия использовали газообразный дейтерий и тяжелую воду. Изотопный обмен проводили при использовании твердофазного и жидкофазного методов. Установлено, что для получения препаративных количеств меченого пирролилкарнозина лучше применять изотопный обмен с дейтериевой водой. При использовании твердофазного метода основная метка находится в пирроле. Включение дейтерия при более высокой температуре происходит более равномерно. Кроме того, использование дейтериевой воды позволило снизить количество немеченого изотомера практически до 0% и получить препарат с выходом 70% и содержанием более 7 атомов дейтерия. Установлено, что содержание атомов дейтерия в веществе можно увеличить, проведя предварительную обработку реакционной смеси газообразным дейтерием. Этот подход открывает дополнительные возможности при получении высокомеченных соединений.

Ключевые слова: пирролилкарнозин, дейтерий, синтез, меченые соединения

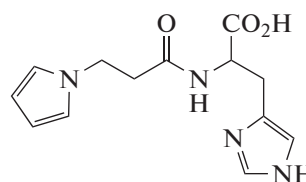
DOI: 10.31857/S2686738922700020, **EDN:** MUUVDR

ПК (3-(1Н-имидазол-5-ил)-2-(3-пиррол-1-ил-пропаноиламино) пропановая кислота) — новое перспективное соединение, синтезированное на основе карнозина и пиррола с учетом их биологических свойств [1].

Нейропротекторная эффективность дипептида карнозина (бета-аланил-L-гистидин), обусловленная его широким спектром биологического действия, включая антиоксидантное, представлена в различных экспериментальных моделях паркинсонизма и ишемии головного мозга, а также в пилотных клинко-биохимических исследованиях [2]. Однако значимым фактором, лимитирующим выход карнозина в практическую медицину в виде лекарственной формы, является его быстрый гидролиз в кровяном русле под действием специфического фермента — сывороточной карнозназы. Одним из способов защиты карнозина от гидролиза является синтез конъюгатов с другими биологически активными

молекулами [3]. Производные второго компонента нового соединения — пиррола (ароматического пятичленного азотистого гетероцикла) нашли широкое применение при синтезе терапевтически активных соединений, включая фунгициды, антибиотики, противоопухолевые средства, нестероидные противовоспалительные препараты [4–6], а также пиррацетам, характеризующийся нейротропным и нейропротекторным действием и входящий в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов РФ.

По исследованным физико-химическим характеристикам новосинтезированное соединение ПК описывается следующей структурной формулой, подтвержденной данными ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения [1]:



Молекулярная масса ПК, определенная методом масс-спектрометрии высокого разрешения, составила 276 г/моль. Полученное в результате флэш-хроматографии вещество обладало чистотой 99% (ЯМР), по данным ВЭЖХ подтвержденная чистота ПК превышала 99% [1].

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра “Курчатовский институт” (НИЦ “Курчатовский институт” — ИМГ), 123182 Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Научный центр неврологии” (ФГБНУ НЦН), 125367 Москва, Россия

*e-mail: nagaev@img.ras.ru

ПК характеризуется высокой устойчивостью к гидролизу сывороточной карнозиназой: в течение 3 ч он практически не подвергался гидролизу, тогда как карнозин гидролизывался за 1 ч на 86% и полностью в течение 3 ч [1].

Антиоксидантная активность ПК, измеренная на модели иницируемого ионами Fe^{2+} перекисного окисления выделенных из сыворотки крови липопротеинов (ЛП), была сопоставима с действием карнозина, а в ряде случаев превышала его эффективность [1].

По данным МТТ-теста ПК не проявлял собственной токсичности при инкубации культуры нейробластомы человека SH-SY5Y, дифференцированной по дофаминергическому типу, в широком диапазоне концентрации в среде культивирования (100, 500, 1000 мкМ, и 2.5, 5.0, 10 мМ) [1].

В условиях окислительного стресса, индуцированного 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлоридом (AAPH) на культуре клеток SH-SY5Y, пирролилкарнозин при его внесении в культуральную среду (в концентрации 10, 50, 250, 500, 1000 мкМ), начиная с концентрации 10 мкМ, увеличивал выживаемость клеток на 10–15% (по данным МТТ-теста) [1].

При моделировании ишемии мозга *in vitro* с использованием модели глюкозо-кислородной депривации (ГКД) на первичной культуре клеток коры больших полушарий мозга крыс ПК в концентрациях 100, 200, 500 и 1000 мкМ при инкубации с ним культуры во время 4 ч ГКД и 24 ч реоксигенации на 10–12% повышал жизнеспособность нейронов (по данным МТТ-теста) и на 20–25% снижал долю погибших клеток (по данным ЛДГ-теста) [1].

В условиях NMDA-индуцированной эксайтотоксичности ПК, внесенный в культуральную среду в концентрациях 200, 500 и 1000 мкМ по данным ЛДГ-теста снижал гибель нейронов культуры коры больших полушарий мозга крыс на 43.8, 46.3 и 43.3%.

Целью данной работы было получение препаративных количеств меченого ПК с содержанием дейтерия более 2 атомов.

Дейтерированные производные низкомолекулярных веществ являются наиболее оптимальными внутренними стандартами для масс-спектрометрического анализа. Дейтерированное производное не отличается по полярности и липофильности от целевого соединения и при пробоподготовке ведет себя аналогично целевому соединению. В то же время отличие по молекулярной массе позволяет измерять хроматограммы указанных веществ независимо.

Нормировка площади пика аналита на площадь хроматографического пика внутреннего стандарта позволяет компенсировать влияние

потерь при извлечении целевого соединения из биологического образца, а также нивелирует возможные природные флуктуации при масс-спектрометрическом анализе. В целом применение дейтерированных стандартов существенно снижает ошибку метода и повышает точность и надежность количественного масс-спектрометрического анализа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Катализаторы, реагенты и растворители — коммерческие препараты: катализатор 5% $\text{Pd}/\text{Al}_2\text{O}_3$ (Merck (США), х.ч.); носитель Al_2O_3 (Merck (США), размер ≤ 10 мкм, чистота 99%). Пирролилкарнозин получен из Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Научный центр неврологии”.

Для введения дейтерия в ПК использовали методы, применяемые для получения меченых соединений [7–12]. Наиболее перспективным считается проведение изотопного обмена в присутствии гетерогенных катализаторов, а в качестве источника дейтерия газообразный дейтерий или дейтериевая вода. Для оптимизации методики введения изотопа использовали ПК, который наносили на Al_2O_3 , с последующим механическим перемешиванием этой смеси с 5% $\text{Pd}/\text{Al}_2\text{O}_3$. Такую смесь можно было обрабатывать и газообразным дейтерием и дейтериевой водой. В первом случае реализовывался твердофазный метод, во втором — жидкофазный. ПК прекрасно растворим в воде. Поэтому при использовании дейтериевой воды пептид переходил в раствор и изотопный обмен происходил при взаимодействии молекул вещества с D_2O в присутствии катализатора.

Включение дейтерия в ПК контролировали масс-спектрометрическим методом на приборе LCQ Advantage MAX (Термоэлектрон, США) типа квадрупольная ионная ловушка, с ионизацией электрораспылением, детектированием масс-спектров в отрицательно заряженных ионах и прямым вводом раствора образца с концентрацией 10 мкг/мл в метаноле.

При нагревании пептида, нанесенного на катализатор, без использования растворителя, как правило, удается получить соединения с большим содержанием изотопа водорода. Но многие соединения оказываются недостаточно устойчивыми в условиях реакции и выход становится неудовлетворительным. В этих случаях пептид наносят на носитель и смешивают с катализатором [9]. ПК наносили на оксид алюминия (1: 100) и растирали с 5% $\text{Pd}/\text{Al}_2\text{O}_3$ при соотношении катализатор-вещество 5: 1. На первом этапе реакцию проводили при 150°C, 175°C, 200°C и 225°C (15 мин, давление D_2 400 гПа) (табл. 1). ПК из ре-

Таблица 1. Распределение дейтерия по изотопомерам в меченом ПК при различной температуре (изотопный обмен с газообразным дейтерием, соотношение в смеси 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–ПК равно 5:100:1)

Изотопомеры	Температура, °C			
	Распределение дейтерия по изотопомерам, в %			
	150°C	175°C	200°C	225°C
D ₀	2.41	2.08	0.88	1.56
D ₁	1.67	0.66	1.04	1.72
D ₂	3.76	1.45	2.18	3.64
D ₃	11.91	5.24	2.60	3.36
D ₄	30.43	15.67	6.33	6.11
D ₅	37.73	32.72	10.75	10.00
D ₆	11.15	30.67	19.14	14.49
D ₇	0.83	9.26	28.70	13.80
D ₈	0.16	1.55	18.46	16.20
D ₉	—	0.62	6.98	8.44
D ₁₀	—	0.15	1.14	6.81
D ₁₁	—	—	0.93	6.73
D ₁₂	—	—	0.73	4.81
D ₁₃	—	—	0.18	2.36
*ΣD	4.29 ± 0.11 (0.84 ± 0.05)	5.14 ± 0.14 (1.40 ± 0.07)	6.51 ± 0.2 (2.53 ± 0.12)	7.13 ± 0.5 (2.92 ± 0.33)
Выход, %	62 ± 5	30 ± 3	10 ± 3	6 ± 2

*ΣD — число атомов дейтерия в молекуле меченого ПК (в скобках — в остатке гистидина).

акционной смеси экстрагировали водным метанолом (MeOH–H₂O 1:2). Для этого в центрифужную пробирку с пробой добавляли 0.1 мл раствора, затем использовали шейкер и центрифугу. Экстракт анализировали масс-спектрометрически и на хроматографе Милихром А-02, колонка ProntoSIL-120-5-C18 AQ (2 × 75 мм, размер частиц 5 мкм). Температура колонки 35°C. Длина волны 210 нм. Элюент А — 0.1% уксусная кислота, элюент Б — метанол, линейный градиент от 0 до 70% Б за 12.5 мин. Скорость подачи элюента 200 мкл/мин. Время удерживания пирролилкарнозина 4.8 мин.

Полученные данные показали, что дейтерий, главным образом, включался в пиррол. При повышении температуры от 150°C до 225°C включение дейтерия в гистидин увеличивалось от 20% до 41%, т.е. при повышении температуры распределение дейтерия становилось более равномерным. Установлено, что при повышении температуры наблюдалась значительная деградация ПК, и в масс-спектрах появлялся пик продукта деградации с *m/z* в районе 218. По-видимому, происходило разрушение ароматических фрагментов. При 175°C в продуктах реакции ПК доминирует, а от-

носительное содержание продукта деградации составляет около 30%, при 200°C доминирует уже продукт деградации, а содержание ПК составляет около 30%, при 225°C относительное содержание ПК падает до ~10%.

Как следует из полученных данных (табл. 1), содержание дейтерия высокое, но выход для препаративного синтеза желательно увеличить. Для этого использовали два подхода. Первый, изменение содержания Al₂O₃ в реакционной смеси относительно ПК (табл. 2). Второй, реакцию проводили не в атмосфере дейтерия, а с дейтериевой водой (табл. 3).

Выход [D]ПК при 150°C в первой серии экспериментов был приемлемым для получения препаративных количеств. Поэтому и при использовании меньшего количества Al₂O₃ изотопный обмен проводили при 150°C. При этой температуре включение дейтерия и выход ПК принципиально не изменились. Таким образом, проведение реакции при 150–170°C в течение 15 мин для получения препаративных количеств [D]ПК и в этом случае является целесообразным (табл. 2).

Таблица 2. Эффективность изотопного обмена с газообразным дейтерием и устойчивость ПК при разных температурах (отношение в смеси 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–ПК 5:20:1)

Изотопомеры	Температура, °C			
	Распределение дейтерия по изотопомерам, в %			
	125°C	150°C	175°C	200°C
D ₀	0.50	0.27	0.12	0.68
D ₁	5.73	0.60	0.45	0.72
D ₂	28.03	1.72	1.10	2.75
D ₃	40.20	6.09	2.04	3.13
D ₄	20.89	22.58	6.31	6.18
D ₅	4.21	45.34	22.28	8.87
D ₆	0.58	21.23	40.58	17.29
D ₇	—	2.19	21.53	24.75
D ₈	—	—	4.38	21.14
D ₉	—	—	1.00	9.07
D ₁₀	—	—	0.27	1.60
D ₁₁	—	—	—	1.71
D ₁₂	—	—	—	1.64
D ₁₃	—	—	—	0.56
*ΣD	2.90 ± 0.1 (0.48 ± 0.03)	4.82 ± 0.14 (1.22 ± 0.05)	5.86 ± 0.19 (1.95 ± 0.08)	6.74 ± 0.32 (2.83 ± 0.18)
Выход	90 ± 6	76 ± 6	28 ± 4	6 ± 2

*ΣD — число атомов дейтерия в молекуле меченого ПК (в скобках — в остатке гистидина).

Масштабирование экспериментов при твердофазном методе введения дейтерия, т.е. пропорциональное увеличение количества вещества и газообразного дейтерия, связано с определенными трудностями. А изменение соотношения количества вещества и газообразного дейтерия может привести к значительному падению содержания изотопа в препарате. При использовании дейтериевой воды обеспечить соответствующее масштабирование намного проще. Обеспечить отношение обменивающихся протонов к количеству дейтериевой воды как 1:50 или даже к 1:100 не составляет труда. Поэтому провели опыты с использованием дейтериевой воды.

При проведении изотопного обмена с дейтериевой водой использовали ту же смесь — 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–ПК (5:20:1) (табл. 3). Эту смесь, содержащую около 0.5 мг ПК, помещали в стеклянную ампулу, вносили 50 мкл дейтериевой воды. Затем ампулу запаивали и помещали в термостат. Реакцию вели 15 мин (табл. 3). После окончания реакции водный слой упаривали. Остаток растворяли в 0.1 мл смеси MeOH–H₂O (1:2) и анализировали, как описано выше.

При этом оказалось, что при использовании дейтериевой воды выход и содержание дейтерия в ПК гораздо меньше зависят от температуры по сравнению с использованием твердофазного метода. Можно предположить, что 3–4 атома дейтерия входят в пирроловый фрагмент из дейтериевой воды и только сверх этого количества дейтерий включается в остальную часть ПК. То есть изменения условий реакции (табл. 3) касаются только небольшого вклада в изотопный обмен в случае ПК.

Совсем другая ситуация наблюдалась, если предварительно выдержать смесь Al₂O₃–5% Pd/Al₂O₃–ПК (20:5:1) в атмосфере газообразного дейтерия для насыщения носителя активированными частицами дейтерия. Затем в ампулу с обработанной смесью вносили дейтериевую воду, продували аргоном, запаивали и нагревали в термостате 15 мин (табл. 3). Включение дейтерия резко возрастало. Таким образом, при использовании данной методики наблюдается значительный эффект активации изотопного обмена. При этом нужно подчеркнуть, что во время выдерживания пептида, нанесенного на катализатор, при

Таблица 3. Изотопный обмен дейтериевой воды со смесью 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–ПК (5:20:1)

Изотопомеры	Температура, °C					
	Распределение дейтерия по изотопомерам, в %					
	125°C		150°C		175°C	
D ₀	0.03*	0.06**	0.03*	0.05**	—*	0.02**
D ₁	0.11	0.41	0.04	0.095	0.04	0.12
D ₂	1.04	3.92	0.28	1.075	0.21	0.88
D ₃	5.40	16.90	2.11	7.94	0.87	6.18
D ₄	15.68	41.07	8.94	30.50	4.12	24.48
D ₅	20.92	36.72	19.04	57.25	11.85	46.85
D ₆	15.52	0.86	16.99	3.03	18.93	18.41
D ₇	14.69	0.05	15.37	0.08	21.22	2.57
D ₈	14.47	0.03	16.38	—	21.00	0.53
D ₉	9.08	—	11.61	—	12.83	0.01
D ₁₀	3.54	—	6.68	—	6.35	—
D ₁₁	0.03	—	2.12	—	1.88	—
D ₁₂	—	—	0.39	—	0.59	—
D ₁₃	—	—	0.02	—	0.12	—
ΣD	6.14 ± 0.14	4.12 ± 0.13	6.78 ± 0.15	4.53 ± 0.11	7.17 ± 0.14	4.85 ± 0.10
ΣD _{His}	1.71 ± 0.06	0.92 ± 0.05	2.00 ± 0.06	0.96 ± 0.06	2.12 ± 0.08	1.23 ± 0.07
(ΣD – ΣD _{His})	4.43 ± 0.18	3.2 ± 0.017	4.78 ± 0.2	3.57 ± 0.17	5.05 ± 0.21	3.62 ± 0.15
Выход, %	89 ± 6	98 ± 7	89 ± 7	96 ± 6	84 ± 8	94 ± 9

* — предварительная обработка смеси 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–ПК газообразным дейтерием (2 ч, давление 400 гПа),

** — использование не активированного газообразным дейтерием катализатора;

ΣD — включение дейтерия в молекулу ПК; ΣD_{His} — включение дейтерия во фрагмент гистидина;

(ΣD–ΣD_{His}) — включение дейтерия в пиррольный фрагмент (рассчитано по разности).

комнатной температуре в атмосфере дейтерия, включения изотопа в его молекулы не наблюдается.

Можно предположить, что включение дейтерия в ароматические фрагменты ПК (пиррол и гистидин) идут параллельно, но с разной скоростью.

По данным табл. 3 видно, что при использовании неактивированного катализатора включение дейтерия изменяется мало. Происходит включение дейтерия в пиррольный фрагмент около 3.20 атома при 125°C, 3.57 атома при 150°C, 3.62 атома при 175°C, т.е. изменение включения дейтерия в этот фрагмент при повышении температуры невелико и, что самое главное, относительный рост содержания дейтерия в ПК имеет тенденцию к уменьшению. Включение дейтерия в гистидин, наоборот, имеет тенденцию к росту. При переходе от 125°C к 150°C увеличение содер-

жания дейтерия в гистидине — 4%, при переходе от 150°C к 175°C — 22%.

При использовании активированного катализатора наблюдается практически полный обмен протия на дейтерий в пиррольном фрагменте. Увеличение содержания дейтерия в гистидине имеет тенденцию к уменьшению. При переходе от 125°C к 150°C увеличение содержания дейтерия в гистидине — 15%, от 150°C к 175°C — 6%. Таким образом, при использовании активированного катализатора итоговый изотопный обмен возрастает, но со временем эффективность его понижается. По-видимому, активированные частицы дейтерия, сольватированные на Al₂O₃ [9], инициируют увеличение изотопного обмена во всех фрагментах молекул ПК, что позволяет поднимать содержание дейтерия в ПК в среднем на треть (схема 1).

с использованием катализаторов, предварительно обработанных газообразными изотопами водорода при сохранении высокого выхода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Федорова Т.Н., Стволинский С.Л., Мигулин В.А., Лопачев А.В., Хуторова А.В., Куликова О.И., Музычук О.А., Абаимов Д.А. Патент № 2777391, 03.08.2022, Бюл. № 22.
2. Boldyrev A., Fedorova T., Stepanova M., Dobrotvorskaya I., Kozlova E., Boldanova N., Bagyeva G., Ivanova-Smolenskaya I., Illarioshkin S. // *Rejuvenation Res.* 2008. Vol. 11. № 4. P. 821–827.
3. Kulikova O.I., Stvolinsky S.L., Migulin V.A., Andreeva L.A., Nagaev I.Yu., Lopacheva O.M., Kulichenkova K.N., Lopachev A.V., Trubitsina I.E., Fedorova T.N. // *Daru.* 2020. Vol. 28. P. 119–130.
4. Adams S.P., Tsang M., Wright J.M. // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2015.
5. Bhardwaj V., Gumber D., Abbot V., Dhiman S., Sharma P. // *RSC Adv.* 2015. Vol. 5. № 20. P. 15233–15266.
6. Карамеев А.Е. // *Современная ревматология.* 2014. Т. 8. № 2. С. 83–89.
7. Toth G., Mallareddy J.R., Toth F., Lipkowski A.W., Tourwe D. // *Arkivoc.* 2012. Vol. 2012. № 5. P. 163–174.
8. Rees A.T. // *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 2004. Vol. 47. № 5. P. 318–319.
9. Voges R., Heys J.R., Moenius T. “Preparation of Compounds Labeled with Tritium and Carbon-14” United Kingdom: John Wiley & Sons. Ltd. 2009. 664 p.
10. Stack D.E., Eastman R. // *J. Label. Compd. Radiopharm.* 2016. Vol. 59. № 12. P. 500–505.
11. Lockley W.J.S., Hesk D. // *J. Label. Compd. Radiopharm.* 2010. Vol. 53. № 11–12. P. 704–715.
12. Lockley W.J.S. // *Tetrahedron Lett.* 1982. Vol. 23. № 37. P. 3819–3822.

SYNTHESIS OF DEUTERIUM-LABELED PYRROLYLCARNOSINE

V. P. Shevchenko^{a, #}, I. Yu. Nagaev^a, T. N. Fedorova^b, and N. F. Myasoedov^a

^a *Institute of Molecular Genetics of National Research Centre “Kurchatov Institute” (NRC “Kurchatov Institute” – IMG), 123182 Moscow, Russian Federation*

^b *Research Center of Neurology (RCN), 125367 Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: nagaev@img.ras.ru*

The effect of temperature on the effectiveness of the introduction of deuterium into pyrrolylcarnosine (PC) has been studied. Deuterium gas and heavy water were used as a source of deuterium. Isotope exchange was carried out using solid-phase and liquid-phase methods. It was found that it is better to use isotope exchange with deuterated water to obtain preparative amounts of labeled pyrrolylcarnosine. When using the solid-phase method, the main label is in pyrrole. The inclusion of deuterium at a higher temperature occurs more evenly. In addition, the use of deuterated water made it possible to reduce the amount of unlabeled isotopomer to almost 0%, obtain a product with a yield of 70% and a content of more than 7 deuterium atoms. It is established that the content of deuterium in the substance can be increased by pretreating the reaction mixture with deuterium gas. This approach opens up additional opportunities for synthesis of labeled compounds.

Keywords: pyrrolylcarnosine, deuterium, isotopic exchange, labeled compounds

УДК 577.15

СТИМУЛЯЦИЯ ОВУЛЯЦИИ У НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ САМОК КРЫС С ПОМОЩЬЮ ОРТОСТЕРИЧЕСКОГО И АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА

© 2023 г. Е. А. Фокина¹, К. В. Деркач¹, А. А. Бахтюков¹, В. Н. Сорокоумов²,
И. А. Лебедев¹, И. Ю. Морина¹, А. О. Шпаков^{1,*}

Представлено академиком РАН Л.Г. Магазаником

Поступило 30.09.2022 г.

После доработки 10.10.2022 г.

Принято к публикации 10.10.2022 г.

Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ) широко используются для лечения репродуктивных расстройств и при контролируемой индукции овуляции, но их применение ограничивается побочными эффектами. Альтернативой могут стать аллостерические агонисты рецептора ЛГ/ХГЧ, в том числе разработанный нами тиено[2,3-д]тиенопиримидин ТР03. Показано, что ТР03 (50 мг/крысу, в/б) при введении неполовозрелым самкам крыс, обработанным за 48 ч до этого Фоллимагом, повышает у них уровень прогестерона (максимум через 8 ч после обработки) и вызывает овуляцию, на что указывает появление через 24 ч желтых тел (8.6 ± 0.5 на яйцник). По своей активности ТР03 сопоставим с ХГЧ, хотя действует более мягко. В отличие от ХГЧ, он не приводит к повышению в яичниках экспрессии фактора роста эндотелия сосудов, который способен вызвать синдром гиперстимуляции яичников. Таким образом, ТР03 является перспективным препаратом, как индуктор овуляции и стимулятор овариального стероидогенеза.

Ключевые слова: индукция овуляции, овариальный стероидогенез, неполовозрелые самки, тиенопиримидин, аллостерический агонист, хорионический гонадотропин, лютеинизирующий гормон

DOI: 10.31857/S2686738922700032, **EDN:** MUDQQJ

Разработка эффективных стратегий для контролируемой индукции овуляции, в том числе при вспомогательных репродуктивных технологиях, является актуальной задачей современной эндокринологии и репродуктивной медицины. В настоящее время для этого используют препараты гонадотропинов — мочевого и рекомбинантного хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) и рекомбинантного лютеинизирующего гормона (ЛГ), но они применяются в сравнительно высоких дозах, и это приводит к гиперстимуляции овариального рецептора ЛГ/ХГЧ и усиливает экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), что может стать причиной синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ) [1]. Наряду с

этим, гонадотропины обладают низкой специфичностью по отношению к внутриклеточным каскадам в клетках-мишенях, что обусловлено взаимодействием активированного гормоном рецептора ЛГ/ХГЧ с различными типами гетеротримерных G-белков (G_s , $G_{q/11}$) и β -аррестинов [2, 3]. Многие побочные эффекты фармакологических препаратов ЛГ и ХГЧ обусловлены тем, что паттерн их N-гликозилирования отличается от такового у природных гормонов [4]. Важно отметить, что N-гликозилирование не только влияет на аффинность гонадотропинов к рецептору, но и играет определяющую роль в их эффекторной специфичности [3, 4].

Все вышесказанное требует разработки альтернативных подходов для индукции овуляции, и большие ожидания здесь связывают с аллостерическими регуляторами рецептора ЛГ/ХГЧ, в том числе с производными тиено[2,3-д]-пиримидина [5, 6]. Нами ранее были разработаны и изучены два тиено[2,3-д]-пиримидиновых производных ТР03 и ТР04, наделенные свойствами полных аллостерических агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ, которые при введении самкам крыс с андрогенным дефицитом, вызванным старением или сахарным

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

² Институт химии, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Санкт-Петербургский государственный университет”, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: alex_shpakov@list.ru

Таблица 1. Удельная масса яичников, число предовуляторных фолликулов и желтых тел у неполовозрелых самок крыс после индукции овуляции с помощью ТР03 или ХГЧ

Группа	Удельная масса яичников, %*	Количество предовуляторных фолликулов, шт./яичник	Количество желтых тел (овулировавших фолликулов), шт./яичник
К	0.020 ± 0.002	Нет	Нет
Ф	0.046 ± 0.004 ^a	1.0 ± 0.5	Нет
ФТ-4	0.042 ± 0.002 ^a	1.8 ± 0.4	Нет
ФТ-8	0.037 ± 0.002 ^a	2.8 ± 0.6	Нет
ФТ-16	0.065 ± 0.006 ^{a,b}	5.6 ± 0.9	Нет
ФТ-24	0.054 ± 0.003 ^a	1.4 ± 0.7	8.6 ± 0.5
ФГ-4	0.066 ± 0.005 ^{a,b}	2.4 ± 0.5	Нет
ФГ-8	0.059 ± 0.010 ^a	3.2 ± 0.4	Нет
ФГ-16	0.078 ± 0.005 ^{a,b}	7.0 ± 0.8	0.8 ± 0.5**
ФГ-24	0.060 ± 0.004 ^{a,b}	Нет	16.6 ± 1.2

*Удельную массу яичников рассчитывали, как соотношение суммы масс левого и правого яичников к общей массе тела (в %).

** — у двух из 5 крыс выявлено по 2 овуляторных фолликула, у остальных они отсутствовали. Различия значимы при $p < 0.05$:

^a — с группой К, ^b — с группой Ф. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n = 5$ в каждой группе.

диабетом, восстанавливали тестикулярный стероидогенез, нормализовали уровень тестостерона, улучшали сперматогенез [7, 8]. Мы предположили, что эти соединения при введении самкам крыс могут выступать в качестве индукторов овуляции, стимулируя овариальный стероидогенез. В пользу этого свидетельствуют данные о том, что соединение Org43553, наделенное активностью агониста рецептора ЛГ/ХГЧ и также относящееся к классу тиено[2,3-d]-пиримидинов, способно индуцировать овуляцию у животных и в условиях клиники у женщин-добровольцев [9, 10]. В соответствии с этим, целью работы было в сравнительном аспекте исследовать способность ХГЧ и ТР03 индуцировать овуляцию у неполовозрелых самок крыс, регулировать овариальный стероидогенез и влиять на экспрессию генов *VegfA* и *VegfB*, кодирующих различные изоформы фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A, VEGF-B), вовлеченные в развитие СГЯ [11]. При этом оценивалась временная динамика изучаемых эффектов ТР03 и ХГЧ.

В опытах использовали неполовозрелых самок крыс линии Wistar возраста 22–24 дня, эксперименты осуществляли в соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН (протокол № 2/4-2021), European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. Для стимуляции фолликулогенеза использовали гонадотропин сыворотки жеребых кобыл Фоллимаг (1000 МЕ/флакон, “Мосагроген”, Россия) (п/к, 15 МЕ/крысу). Спустя 48 ч после обработки Фоллимагом крысам вводили индукторы овуляции — ТР03 (в/б, 50 мг/кг) или ХГЧ (п/к, 15 МЕ/крысу). После введения ТР03 или ХГЧ через 4, 8, 16 или 24 ч у животных забирали влажалошные мазки для микроскопии.

До и через соответствующие временные интервалы после введения индукторов овуляции крыс анестезировали (хлоральгидрат, 400 мг/кг, в/б), декапитировали, забирали и взвешивали яичники, морфологически оценивали число созревших фолликулов, измеряли экспрессию овариальных генов. Из шейных вен забирали кровь для определения стероидных гормонов. Формировали 10 групп (во всех $n = 5$): контрольные крысы (К), получавшие вместо препаратов их растворители; крысы, которых обрабатывали только Фоллимагом (через 48 ч после инъекции) (Ф); крысы, которых через 48 ч после инъекции Фоллимага обрабатывали ТР03 (в/б, 50 мг/кг) или ХГЧ (п/к, 15 МЕ/крысу) и декапитировали через 4, 8, 16 и 24 ч после введения ТР03 (ФТ-4, ФТ-8, ФТ-16, ФТ-24) или ХГЧ (ФГ-4, ФГ-8, ФГ-16, ФГ-24).

Для морфологического анализа яичники в течение 48 ч (+4°C) фиксировали в 4%-ном растворе пара-формальдегида, который готовили в фосфатном буфере (0.1 М, pH 7.2), содержащем 0.9% NaCl (PBS). После промывки в PBS образцы помещали в 30%-ный раствор сахарозы в PBS (+4°C) и после криопротекции замораживали на сухом льду в среде Tissue-Tek® (“Sacura, FinetekEurope”, Нидерланды). Продольные срезы яичника (10 мкм) получали с помощью криостата Leica CM-1520 (“Leica Microsystems”, Германия), каждый десятый из них монтировали на стекла Super-Frost/plus (“Menzel”, Германия) и высушивали. После обработки 50%-ным раствором этанола (15 мин) стекла окрашивали Sudan-3 (15 мин), затем докрашивали гематоксилином и заключали под покровное стекло с глицерином. Изображения анализировали с помощью микроскопа Carl Zeiss Imager A1 (“Carl Zeiss”, Германия) с видеокамерой AxioCam 712 и программным

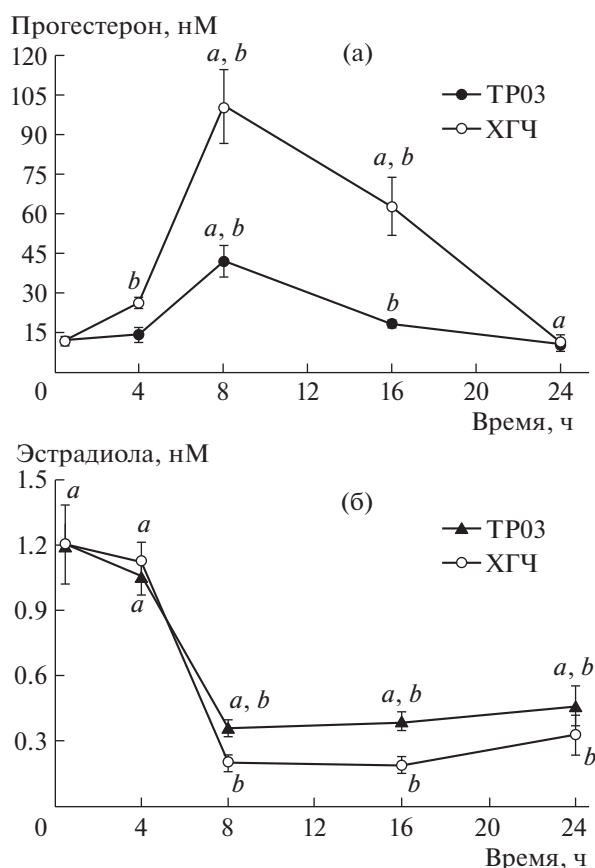


Рис. 1. Изменение содержания прогестерона (а) и эстрадиола (б) в крови неполовозрелых самок крыс в течение 24 ч после введения индукторов овуляции — TP03 и ХГЧ.

В контрольной группе концентрация прогестерона в крови составила 20.9 ± 3.7 нМ, эстрадиола — 0.19 ± 0.03 нМ. В опытных группах образцы сыворотки крови получали через 48 ч после стимуляции фолликулогенеза (группа Ф, точка 0) и затем через 4, 8, 16 и 24 ч после индукции овуляции TP03 (группы ФТ-4, ФТ-8, ФТ-16, ФТ-24) или ХГЧ (группы ФГ-4, ФГ-8, ФГ-16, ФГ-24). Различия значимы при $p < 0.05$: а — с группой К, б — с группой Ф. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n = 5$ в каждой группе.

обеспечением Zen 3.4. Согласно гистологическому атласу [12], на срезах подсчитывали количество предовуляторных фолликулов и желтых тел, по которым оценивали число фолликулов, подвергнувшихся овуляции. Уровни эстрадиола и прогестерона в крови крыс определяли с помощью ИФА-анализа, используя наборы “Эстрадиол-ИФА” и “Прогестерон-ИФА” (“ХЕМА”, Россия). Тотальную РНК из яичников выделяли с помощью реагента ExtractRNA (“Евроген”, Россия), и проводили обратную транскрипцию с помощью набора “MMLV RT Kit” (“Евроген”, Россия). ПЦР осуществляли на амплификаторе Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System (“Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.”, США) в смеси, содержащей 0.4 мкМ прямо-

го и обратного праймеров, используя реагент qPCR-HS SYBR+Low ROX (“Евроген”, Россия). Экспрессию генов *VegfA* и *VegfB* оценивали с помощью метода delta-delta- C_t , используя ген актина В (*Actb*) в качестве референсного, как описано ранее [7]. Статистический анализ проводили с помощью программы “Microsoft Office Excel 2007” (США). Результаты представляли, как $M \pm SEM$. Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Исследование удельной массы яичников показало значимое ее повышение во всех группах с введением Фоллимага, в том числе с обработкой TP03 и ХГЧ (табл. 1). Морфологический анализ яичников показал, что количество предовуляторных фолликулов при обработке крыс обоими индукторами овуляции нарастало в течение 16 ч после их введения. Через 24 ч число предовуляторных фолликулов резко снижалось (TP03) или они вообще не обнаруживались (ХГЧ) (табл. 1). Желтые тела, соответствующие овуляторным фолликулам, в значимых количествах были выявлены у животных в группах ФТ-24 и ФГ-24, что указывает на индукцию у них овуляции (табл. 1).

Уровень прогестерона в крови существенно повышался через 8 ч после обработки TP03 и ХГЧ, в большей степени в случае ХГЧ (рис. 1а). Повышение уровня прогестерона сохранялось через 16 ч после обработки ХГЧ, но исчезало через 24 ч, что согласуется с данными других авторов об остром пике повышения уровня прогестерона в крови неполовозрелых крыс после введения ХГЧ и последующем его снижении [13, 14]. Рассчитанное значение AUC_{4-24} для кривой “концентрация прогестерона (нМ)—время (ч)” в случае ХГЧ существенно превосходило соответствующее значение для TP03 (1208 ± 156 vs. 475 ± 42 , $p < 0.002$). Уровень эстрадиола в группах с обработкой TP03 и ХГЧ, напротив, значимо снижался в сравнении с группой Ф (рис. 1б). Снижение было более эффективным при использовании гонадотропина, на что указывает более низкое значение AUC_{4-24} для кривой “концентрация эстрадиола (нМ)—время (ч)” в случае ХГЧ в сравнении с TP03 (6.30 ± 0.74 vs. 9.29 ± 0.72 , $p < 0.05$). О снижении уровня эстрадиола после индукции овуляции с помощью ХГЧ у неполовозрелых крыс сообщали и другие авторы [13, 15]. Одной из причин этого является изменение доступности тестостерона для ароматазы, превращающей его в эстрадиол [15]. Тем самым, динамика стероидогенных эффектов у TP03 и ХГЧ была сходной, но ХГЧ действовал эффективнее.

Полученные данные свидетельствуют о том, что, как и в случае стимуляции тестикулярного стероидогенеза [7, 8], эффект аллостерического агониста TP03 на овариальный стероидогенез является более умеренным в сравнении с ХГЧ, а ак-

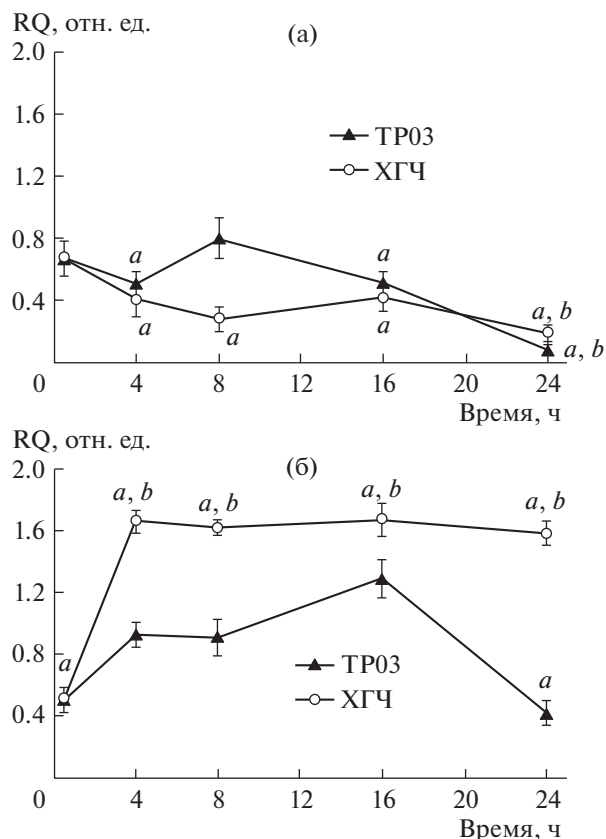


Рис. 2. Экспрессия генов *VegfA* (а) и *VegfB* (б), кодирующих изоформы А и В фактора роста эндотелия сосудов, в яичниках неполовозрелых крыс, и влияние на них индукторов овуляции — ТР03 и ХГЧ.

В контрольной группе экспрессия генов *VegfA* и *VegfB* в яичниках составила 1.03 ± 0.09 и 1.04 ± 0.08 отн. ед., соответственно. В опытных группах ткани яичников получали через 48 ч после стимуляции фолликулогенеза (группа Ф, точка 0) и затем через 4, 8, 16 и 24 ч после индукции овуляции ТР03 (группы ФТ-4, ФТ-8, ФТ-16, ФТ-24) или ХГЧ (группы ФГ-4, ФГ-8, ФГ-16, ФГ-24). Различия значимы при $p < 0.05$: а — с группой К, b — с группой Ф. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n = 5$ в каждой группе.

тивность ТР03, как индуктора овуляции, выражена в меньшей степени. Однако это имеет определенные преимущества, поскольку позволяет избежать СГЯ, истощения овариального резерва и снижения качества яйцеклеток, которые часто встречаются при использовании ХГЧ [1]. Для сравнительного изучения возможных рисков развития СГЯ при применении ТР03 и ХГЧ в яичниках оценивали экспрессию генов *VegfA* и *VegfB*, кодирующих VEGF-A и VEGF-B, которые могут являться индукторами СГЯ [11]. Показано, что экспрессия *VegfA* и *VegfB* в группе Ф с обработкой одним Фоллимагом снижалась (рис. 2). ТР03 и ХГЧ слабо влияли на сниженную в группе Ф экспрессию гена *VegfA*, за исключением временного интервала 24 ч, когда оба агониста подавляли ее в

еще большей степени (рис. 2а). В случае экспрессии гена *VegfB* ситуация была иной. ХГЧ вызывал значительную ее стимуляцию в сравнении с группой Ф, в то время как ТР03 влиял на экспрессию *VegfB* в небольшой степени, значимо повышая ее только у крыс группы ФТ-16 (рис. 2б). Эти данные свидетельствуют о том, что ХГЧ, несмотря на используемую в нашем исследовании сравнительно невысокую дозу препарата, в течение суток после введения поддерживает высокий уровень экспрессии VEGF-B. Это, в совокупности с более высокой удельной массой яичников на протяжении эксперимента, указывает на существенные риски развития СГЯ, которые часто встречаются при использовании гонадотропинов для контролируемой индукции овуляции [1]. В свою очередь, ТР03 существенно не влиял на экспрессию VEGF-B, что может свидетельствовать о низкой вероятности развития СГЯ.

Таким образом, нами впервые показано, что ТР03, агонист рецептора ЛГ/ХГЧ, взаимодействующий с его трансмембранным аллостерическим сайтом, как и коммерческий препарат ХГЧ, взаимодействующий с внеклеточным ортостерическим сайтом рецептора, характеризуется способностью стимулировать продукцию прогестерона и индуцировать овуляцию у неполовозрелых самок крыс. При этом ТР03 в сравнении с ХГЧ действовал на яичники более мягко, в меньшей степени повышая уровень прогестерона в крови и приводя к образованию вдвое меньшего числа желтых тел. В то же время ТР03, в отличие от ХГЧ, не вызывал повышения экспрессии гена VEGF-B в яичниках, что минимизирует вероятность развития СГЯ, ассоциированного с активацией VEGF-зависимых сигнальных путей и являющегося одним из тяжелых осложнений при использовании гонадотропинов при осуществлении контролируемой индукции овуляции во вспомогательных репродуктивных технологиях.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры по уходу за животными и их использованию в исследовании осуществляли в строгом соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН (протокол № 2/4-2021), European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Российским научным фондом (№ 19-75-20122).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Martinez F., Racca A., Rodríguez I., et al.* Ovarian stimulation for oocyte donation: a systematic review and meta-analysis // *Hum Reprod Update*. 2021. V. 27. P. 673–696.
2. *Ricetti L., Yvinec R., Klett D., et al.* Human Luteinizing Hormone and Chorionic Gonadotropin Display Biased Agonism at the LH and LH/CG Receptors // *Sci Rep*. 2017. V. 7. P. 940.
3. *Casarini L., Simoni M.* Recent advances in understanding gonadotropin signaling // *Fac Rev*. 2021. V. 10. P. 41.
4. *Jiang X., Dias J.A., He X.* Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors: insights to signaling // *Mol Cell Endocrinol*. 2014. V. 382. P. 424–451.
5. *van Koppen C.J., Zaman G.J., Timmers C.M., et al.* A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor // *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 2008. V. 378. P. 503–514.
6. *Nataraja S.G., Yu H.N., Palmer S.S.* Discovery and Development of Small Molecule Allosteric Modulators of Glycoprotein Hormone Receptors // *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015. V. 6. P. 142.
7. *Bakhtuykov A.A., Derkach K.V., Gureev M.A., et al.* Comparative Study of the Steroidogenic Effects of Human Chorionic Gonadotropin and Thieno[2,3-D]pyrimidine-Based Allosteric Agonist of Luteinizing Hormone Receptor in Young Adult, Aging and Diabetic Male Rats // *Int J Mol Sci*. 2020. V. 21. P. 7493.
8. *Bakhtuykov A.A., Derkach K.V., Sorokoumov V.N., et al.* The Effects of Separate and Combined Treatment of Male Rats with Type 2 Diabetes with Metformin and Orthosteric and Allosteric Agonists of Luteinizing Hormone Receptor on Steroidogenesis and Spermatogenesis // *Int J Mol Sci*. 2021. V. 23. P. 198.
9. *van de Lagemaat R., Timmers C.M., Kelder J., et al.* Induction of ovulation by a potent, orally active, low molecular weight agonist (Org 43553) of the luteinizing hormone receptor // *Hum Reprod*. 2009. V. 24. P. 640–648.
10. *Gerrits M., Mannaerts B., Kramer H., et al.* First evidence of ovulation induced by oral LH agonists in healthy female volunteers of reproductive age // *J Clin Endocrinol Metab*. 2013. V. 98. P. 1558–1566.
11. *Fang L., Li Y., Wang S., et al.* TGF- β 1 induces VEGF expression in human granulosa-lutein cells: a potential mechanism for the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome // *Exp Mol Med*. 2020. V. 52. P. 450–460.
12. *Быков В.Л., Юшканцева С.И.* Гистология, цитология и эмбриология. М.: Издательская группа “ГЭОТАР-Медиа”; 2018. [Bykov V.L., Yushkanceva S.I. Gistologiya, citologiya i embriologiya. M.: Izdatel'skaya gruppa “GEOTAR-Media”; 2018. (In Russ.)]
13. *Gao X., Greenbaum L.M., Mahesh V.B., et al.* Characterization of the kinin system in the ovary during ovulation in the rat // *Biol Reprod*. 1992. V. 47. P. 945–951. <https://doi.org/10.1095/biolreprod47.6.945>
14. *Duggal P.S., Van Der Hoek K.H., Milner C.R., et al.* The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat // *Endocrinology*. 2000. V. 141. P. 1971–1976.
15. *Stevenson P.M., Klinken S.P., Boyne P., et al.* Identification of the enzymic control point in “de-differentiation” of oestrogen synthesis in superovulated rat ovary // *Biochim Biophys Acta*. 1982. V. 713. P. 251–259.

STIMULATION OF OVULATION IN IMMATURE FEMALE RATS USING ORTHOSTERIC AND ALLOSTERIC LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR AGONISTS

**E. A. Fokina^a, K. V. Derkach^a, A. A. Bakhtuykov^a, V. N. Sorokoumov^b, I. A. Lebedev^a,
I. Yu. Morina^a, and A. O. Shpakov^{a, #}**

^a *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
St. Petersburg, Russian Federation*

^b *Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation*

[#] *e-mail: alex_shpakov@list.ru*

Presented by Academician of the RAS L.G. Magazanik

Human chorionic gonadotropin (hCG) and luteinizing hormone (LH) are widely used for the treatment of reproductive disorders and for controlled ovulation induction, but their use is limited by side effects. Allosteric agonists of the LH/hCG receptor, including thieno[2,3-d]thienopyrimidine TP03 developed by us, can become an alternative. TP03 (50 mg/rat, i.p.) when administered to immature female rats treated 48 hours before with Follimag has been shown to increase progesterone levels (maximum 8 hours post-treatment) and induce ovulation, as indicated by the appearance at 24 hours corpus luteum (8.6 ± 0.5 per ovary). In terms of its activity, TP03 is comparable to hCG, although it acts more moderately. In the ovaries, unlike hCG, TP03 does not lead to an increase in the expression of vascular endothelial growth factor, which can cause ovarian hyperstimulation syndrome. Thus, TP03 is a promising drug as an ovulation inducer and ovarian steroidogenesis stimulator.

Keywords: ovulation induction, ovarian steroidogenesis, immature females, thienopyrimidine, allosteric agonist, chorionic gonadotropin, luteinizing hormone

УДК 577.113.3.017

СИНТЕЗ 1-[ω-(БРОМФЕНОКСИ)АЛКИЛ]-3-НАФТАЛЕНИЛМЕТИЛ-ПРОИЗВОДНЫХ УРАЦИЛА И ИХ АНАЛОГОВ КАК ВЕРОЯТНЫХ ИНГИБИТОРОВ РЕПЛИКАЦИИ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. М. П. Парамонова¹, Е. С. Гуреева¹, А. А. Озеров¹, R. Snoeck², G. Andrei², Д. А. Александров³, А. Л. Хандажинская^{4,*}, М. С. Новиков¹, академик РАН С. Н. Кочетков⁴

Поступило 30.09.2022 г.
После доработки 05.10.2022 г.
Принято к публикации 05.10.2022 г.

Осуществлен синтез нового ряда 1-[ω-(бромфенокси)алкил]-производных урацила, содержащих в положении 3 остатка урацила нафтаден-1-ил-, нафтаден-2-ил-, 1-бромнафтаден-2-илметильный, бензильный и антрацен-9-илметильный фрагмент. Были изучены противовирусные свойства синтезированных соединений в отношении цитомегаловируса человека. Было обнаружено, что соединение, имеющее в своем составе мостик, состоящий из пяти метиленовых групп, обладает высокой анти-цитомегаловирусной активностью *in vitro*.

Ключевые слова: производные урацила, синтез, противовирусная активность, цитомегаловирус человека

Список сокращений. HCMV – цитомегаловирус человека, ВИЧ – вирус иммунодефицита человека, СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита, ДМФА – *N,N*-диметилформамид

DOI: 10.31857/S2686738922700044, EDN: MJOYWY

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы являются причиной многих инфекционных заболеваний. Цитомегаловирус человека (HCMV), являющийся одной из наиболее распространенных причин инфекций человека, инфицирует Т-клетки и изменяет их ответ. Предполагается, что HCMV способствует развитию атеросклероза [1], иммунного старения [2], провоцирует воспалительные заболевания кишечника [3] и может содействовать развитию рака благодаря онкомодулирующему эффекту [4, 5]. Однако главное медицинское значение HCMV – это врожденная инфекция, которая вызывает у новорожденных потерю слуха, а также в некоторых случаях приводит к серьезным заболеваниям: микроцефалии, умственной отсталости, гепатоспленомегалии и тромботической тромбоцитопенической пурпуре [6]. Кроме того, врожденная

HCMV инфекция может привести к потере плода и смерти новорожденных [6, 7].

В настоящее время для лечения заболеваний, вызванных HCMV, применяются ингибиторы вирусной ДНК-полимеразы: ганцикловир, цидофовир и фоскарнет, а также их пролекарственные формы – валганцикловир и бринцидофовир [8]. Однако эти препараты вызывают множество побочных эффектов, которые включают токсическое воздействие на костный мозг (ганцикловир, валганцикловир и цидофовир) и почки (фоскарнет, цидофовир и бринцидофовир) [9, 10]. Кроме того, длительная терапия, проводимая при HCMV инфекции, может приводить к возникновению устойчивых вариантов HCMV [11]. Недавно были одобрены имеющие иной механизм действия летермовир и нуклеозидный аналог марибавир в качестве средств для профилактики HCMV-инфекции у пациентов с трансплантацией аллогенных стволовых клеток [12, 13]. Однако, несмотря на низкую токсичность, их использование также приводило к появлению резистентных к летермовиру и марибавиру вариантов HCMV [14]. По этой причине поиск новых высокоэффективных анти-HCMV агентов является важной и актуальной задачей.

Ранее нами была описана серия 1-[ω-(фенокси)алкил]-производных урацила, которые ингибировали репликацию HCMV в концентрациях, сравнимых с действием ганцикловира [15]. Введение в положение 3 пиримидинового кольца

¹ Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

² Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, Herestraat 49 bus 1043, Leuven B-3000, Belgium

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

⁴ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: khandazhinskaya@bk.ru

(4-феноксифенил)-ацетамидного фрагмента привело к усилению вирусингибиторных свойств [16]. В литературе были описаны 3-(3,5-диметилбензил)-производные 1-бензил- и 1-(пиридилметил)урацила, проявляющие двойную активность как в отношении ВИЧ-1, так и в отношении HCMV [17, 18]. Недавно нами был обнаружен ряд 1-циннамил-производных урацила, содержащих при атоме азота N³ бензильный и нафтален-1-илметильный заместители, которые также обладали активностью в отношении ВИЧ-1 и HCMV [19]. Также высокую анти-HCMV активность проявили производные 1-[5-(4-бромфеноксипентил)урацила], которые имели при атоме азота N³ 3-(4-оксохиназолин-3(4H)-ил)пропильный [20] или 3-[(4-метил-2-оксо-2H-хромен-7-ил)окси]пропильный заместитель [21].

В этой связи нами было сделано предположение о том, что наличие объемного заместителя у атома азота N³ пиримидинового кольца дает соединения, обладающие высокой активностью в отношении HCMV. В рамках этой гипотезы нами был осуществлен синтез ряда 1-[ω-(феноксикал)-производных урацила, содержащих нафталенилметильный заместитель в положении 3 остатка урацила.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все реагенты были получены от компаний Sigma-Aldrich и Acros Organics и были использованы без предварительной очистки.

Общий метод получения 3-арилметил-1-[ω-(бромфеноксикал)-производных урацила 11–19 и 22–24. Суспензию 1-[ω-(4-бромфеноксикал)-производного урацила 1–7 или 1-[5-(4-бромфеноксипентил)хиназолин-2,4(1H,3H)-дион (25) (1.416 ммоль) и свежепрокаленного карбоната калия (0.3 г, 2.171 ммоль) перемешивали в растворе ДМФА (10 мл) при 80°C в течение 1 ч, охладили до комнатной температуры и добавили раствор бромметилнафталина 8–10, бензилхлорида (20) или 9-(хлорметил)антраценом (21) (1.469 ммоль) в ДМФА (5 мл). Полученную смесь перемешивали при той же температуре в течение 24 ч, упарили при пониженном давлении и остаток обработали водой (80 мл). Смесь экстрагировали 1,2-дихлорэтаном (4 × 20 мл), объединенный экстракт упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя смесью этилацетат-1,2-дихлорэтан (1:1), фракции, содержащие продукт, объединяли и упаривали в вакууме. Остаток кристаллизовали из смеси этилацетат-гексан (1:1). Целевые соединения 11–19, 22–24 были получены с выходами 74–89%.

1-[5-(4-Бромфеноксипентил)хиназолин-2,4(1H,3H)-дион (25). Суспензию хиназолин-2,4(1H,3H)-диона (4.0 г, 24.67 ммоль) и свежepro-

каленного карбоната калия (0.86 г, 6.222 ммоль) перемешивали в растворе ДМФА (50 мл) при 80°C в течение 1 ч, добавили раствор 1-бром-4-[(5-бромпентил)окси]бензола (26) (1.99 г, 6.179 ммоль) в ДМФА (20 мл) и полученную смесь перемешивали при той же температуре в течение 24 ч. Реакционную массу упарили при пониженном давлении, остаток обработали водой (100 мл) и экстрагировали 1,2-дихлорэтаном (4 × 50 мл), объединенный экстракт упаривали при пониженном давлении. Остаток нанесли на колонку с силикагелем и элюировали этилацетатом, фракции, содержащие продукт, объединяли и упаривали в вакууме. Остаток кристаллизовали из смеси изопропанол-гексан (1:1). Получили 1.7 г белого мелкокристаллического продукта. Выход 68%, т. пл. 178–180°C, R_f 0.80 (этилацетат).

1-(Нафтален-1-илметил)урацил (28). К раствору 2,4-бис(триметилсилилокси)пиримидина, полученного из урацила (1.5 г, 13.38 ммоль), в безводном 1,2-дихлорэтано (50 мл) добавили 1-(бромметил)нафталин (8) (2.85 г, 13.50 ммоль). Полученную смесь кипятили с обратным холодильником с защитой от влаги воздуха в течение 36 ч. Реакционную массу охладили до комнатной температуры, обработали изопропанолом (10 мл), упарили при пониженном давлении на 2/3 объема и разбавили гексаном (20 мл). Выпавший осадок отфильтровали и перекристаллизовали из смеси ДМФА-вода (2:1). Получили 2.26 г мелкокристаллического продукта белого цвета. Выход 67%, т. пл. 266–268°C (262–266°C лит.²¹), R_f 0.44 (этилацетат).

3-[5-(4-Бромфеноксипентил)-1-(нафтален-1-илметил)урацил (27). Суспензию 1-(нафтален-1-илметил)урацил (28) (0.5 г, 1.982 ммоль) и свежeproкаленного карбоната калия (0.5 г, 3.618 ммоль) перемешивали в растворе ДМФА (10 мл) при 80°C в течение 1 ч, добавили раствор 1-бром-4-[(5-бромпентил)окси]бензола (26) (0.64 г, 1.987 ммоль) и полученную смесь перемешивали при той же температуре в течение 24 ч. Реакционную массу упарили при пониженном давлении и остаток обработали водой (80 мл). Смесь экстрагировали 1,2-дихлорэтаном (4 × 20 мл), объединенный экстракт упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя смесью этилацетат-1,2-дихлорэтан (1:1), фракции, содержащие продукт, объединяли и упаривали в вакууме. Остаток кристаллизовали из смеси этилацетат-гексан (1:1). Получили 0.83 г мелкокристаллического продукта белого цвета. Выход 85%, т. пл. 92.5–93.5°C, R_f 0.65 (этилацетат-1,2-дихлорэтан, 1:1).

Противовирусные исследования и оценка цитостатической активности

Соединения были оценены в отношении следующих вирусов: цитомегаловирус человека (HCMV,

штаммы AD-169 и Davis) и вирус ветряной оспы (VZV, штаммы ОКА и YS). Противовирусные исследования основывались на ингибировании цитопатического эффекта, вызванного вирусом или образования бляшек в культуре клеток легкого эмбриона человека (HEL) по опубликованной методике [21]. Исследования цитостатической активности также проводили методом, описанным ранее [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение исходных 1-[ω-(4-бромфенокси)алкил]-производных урацила **1–6** было описано ранее [15]. Синтез 1-[5-(3-бромфенокси)ура-

цила (**7**) описан в работе Парамоновой и др. [21]. Получение целевых соединений нафталенилметильного ряда заключалось в алкилировании 1-[ω-(фенокси)алкил]-производных урацила **1–7** 1-(бромметил)нафталином (**8**, $R_3=H$), 2-(бромметил)нафталином (**9**, $R_3=H$) или 1-бром-2-(бромметил)нафталином (**10**, $R_3=Br$) в ранее описанных условиях [18, 22]. В растворе ДМФА в присутствии K_2CO_3 образовывались соответствующие 1-[ω-(фенокси)алкил]-3-(нафтален-1-илметил)- **11–14** или 3-(нафтален-2-илметил)-производные урацила **18, 19** (схема 1), выход которых был в пределах 74–89%.

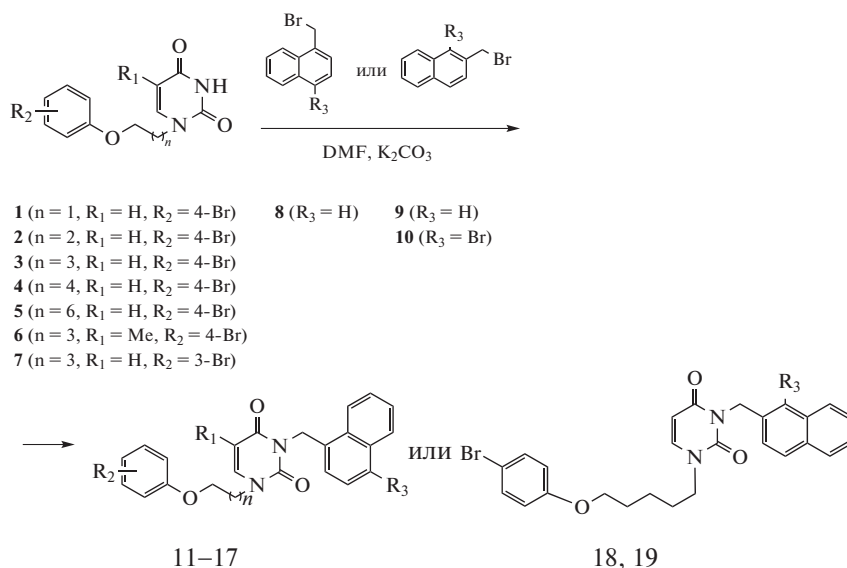


Схема 1

Для изучения закономерности структура-противовирусная активность был синтезирован ряд аналогов. В частности, путем обработки урацила **1** бензилхлоридом (**20**) или 9-(хлорметил)антраценом

(**21**) в растворе ДМФА в присутствии K_2CO_3 были получены 1-[5-(4-бромфенокси)пентил]-3-бензил- (**22**) и -(антрацен-9-илметил)урацилы (**23**), выход которых составил 81 и 79% (схема 2).

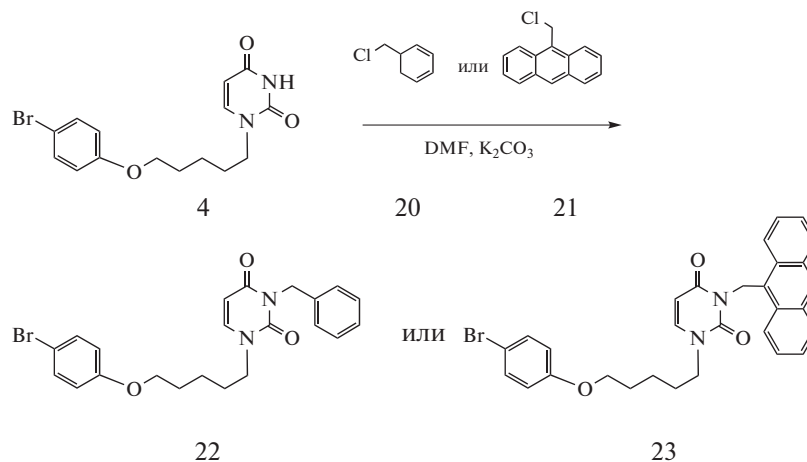


Схема 2

Еще одним аналогом явился 1-[5-(4-бромфенокси)пентил]-3-(нафтален-1-илметил)хиназолин-2,4(1*H*,3*H*)-дион (**24**). Исходный 1-[5-(4-бромфенокси)пентил] хиназолин-2,4(1*H*,3*H*)-дион (**25**) был получен путем алкилирования 4-х кратного мольного избытка хиназолин-2,4(1*H*,3*H*)-диона

1-бром-4-[(5-бромпентил)окси]бензола (**26**) в растворе ДМФА в присутствии K_2CO_3 . 1-Замещенный хиназолин-2,4(1*H*,3*H*)-дион (**25**) действием 1-(бромметил)нафталином (**8**) с выходом 77% превращали в целевое соединение **24** (схема 2).

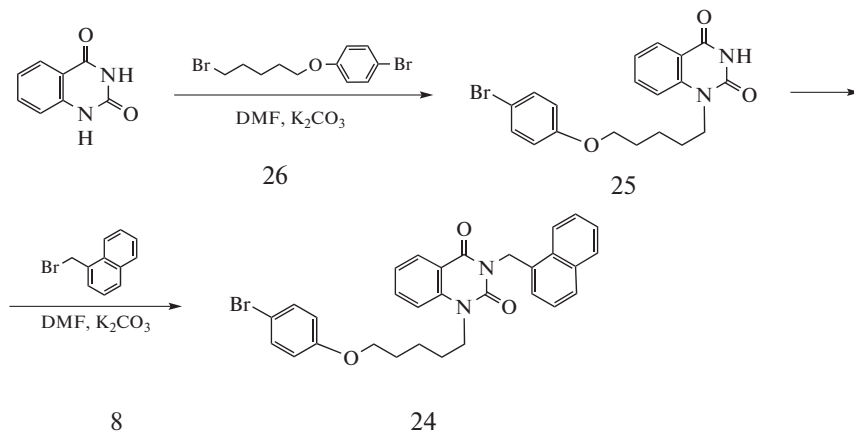


Схема 3

В заключение был получен изомер соединения **14** – 3-[5-(4-бромфенокси)пентил]-1-(нафтален-1-илметил)урацил (**27**). Его синтез включал стадию получения 1-(нафтален-1-илметил)урацила (**28**) путем конденсации 2,4-бис(триметилсилил)оксипиримидина с 1-(бромметил)нафталином (**8**) при кипячении в растворе безводного 1,2-дихлорэтана. Урацил **28** в растворе ДМФА в присутствии K_2CO_3 обрабатывали 1-бром-4-[(5-бромпентил)окси]бензолом (**26**), что вело с выходом 85% к целевому соединению **27** (схема 4).

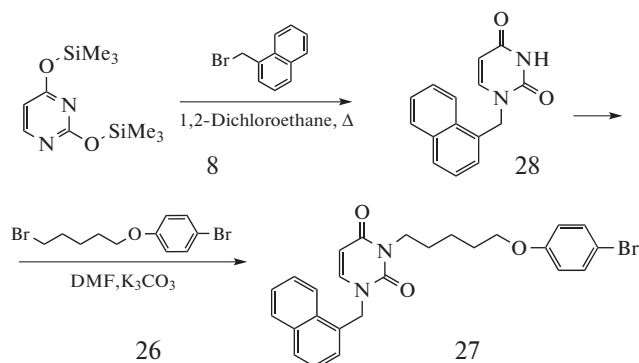


Схема 4

Активность соединений оценивали в отношении вируса герпеса простого типа 1, вируса герпеса простого типа 2, вируса ветряной оспы, вируса осповакцины, респираторно-синцитиального вируса, вируса везикулярного стоматита, вируса Коксаки В4, вируса парагриппа 3, вируса гриппа А (подтипы Н1Н1, Н3Н2), вируса гриппа В, реовируса-1, вируса Синдбис, вируса Пунта Торо, а

также в отношении HCMV (штаммы AD-169 и Davis).

Активность соединений **11–19**, **22–24** и **27** в отношении HCMV была изучена в культуре HEL-клеток. Результаты исследования представлены в табл. 1. Обнаружено, что соединение **13** проявило заметную анти-HCMV-активность: оно блокировало репликацию вируса в концентрации (EC_{50}) 2.19 μM (штаммы AD-169 и Davis), что заметно превосходило действие ганцикловира и было сравнимо с действием цидофовира. Соединения **11** и **12**, имеющие короткий мостик, оказались менее эффективными ингибиторами репликации HCMV. Их EC_{50} было в пределах 8.94–10.94 μM . В то же время удлинение мостика до шести и особенно до восьми метиленовых групп вело к усилению цитотоксичности (соединения **14** и **15**). Перемещение атома брома в 4-бромфеноксильном фрагменте из *пара*-положения в *мета*-положение вело к полной потере противовирусной активности (соединение **16**). Тиминовый аналог соединения **13** (соединение **17**) оказался более чем на порядок менее активным (EC_{50} 44.72 и 48.9 μM для штаммов AD-169 и Davis соответственно). Нафтален-2-ильный аналог **18** и его 1-бром-производное **19** не проявили какой-либо ингибиторной активности. По-видимому, пространственное положение нафталинового фрагмента играет важную роль в проявлении противовирусных свойств. Замена нафталинового фрагмента на бензильный дало соединение **22** с достаточно интересными свойствами, EC_{50} которого составила 10.9 μM (штамм AD-169) и 15.3 μM (штамм Davis).

Таблица 1. Анти-HCMV свойства 3-арилметил-1-[ω-(бромфенокси)алкил]-производных урацила **11–19, 22–24** и **27**

Соединение	R_1	R_2	R_3	n	Противовирусная активность, EC ₅₀ (мкМ) ^a		Цитотоксичность (мкМ)	
					AD-169	Davis	Морфология клеток (MCC) ^b	Рост клеток (CC ₅₀) ^c
11	H	4-Br	H	1	9.78	10.94	100	>100
12	H	4-Br	H	2	8.94	8.94	100	10.82
13	H	4-Br	H	3	2.19	2.19	>100	75.7
14	H	4-Br	H	4	>4	8.94	20	—
15	H	4-Br	H	6	>0.8	1.79	4	—
16	H	3-Br	H	3	>20	>100	20	—
17	Me	4-Br	H	3	44.72	48.9	100	—
18	—	—	H	3	>4	>4	20	—
19	—	—	Br	3	>20	>20	100	—
22	—	—	—	—	10.9	15.3	100	>100
23	—	—	—	—	>4	>4	20	—
24	—	—	—	—	>100	>100	>100	—
27	—	—	—	—	36.57	44.72	>100	—
Ганцикловир	—	—	—	—	3.15	9.21	>350	>350
Цидофовир	—	—	—	—	1.49	1.49	>300	>300

^a Эффективная концентрация, необходимая для снижения образования бляшек вируса на 50%.

^b Минимальная цитотоксическая концентрация, которая вызывает микроскопически детектируемые изменения морфологии клеток.

^c Цитотоксическая концентрация, необходимая для снижения клеточного роста на 50%.

3-(Антрацен-9-илметил)-производное **23** оказалось полностью неактивным. Замена остатка урацила на хиназолин-2,4(1*H*,3*H*)-дионовый дало также неактивное соединение **24**. Региоизомер соединения **13**—3-[5-(4-бромфенокси)пентил]-1-(нафтален-1-илметил)урацил (соединение **27**) оказался более чем на порядок менее активным в отношении HCMV.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами обнаружен ряд высокоактивных анти-HCMV агентов, которые подавляли репликацию HCMV в концентрациях, превосходящих действие ганцикловира и сравнимых с действием цидофовира. Результаты данного исследования послужат основой для создания высокоэффективного лекарственного средства для лечения HCMV инфекций.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме “Производные нуклеиновых оснований как ингибиторы репликации SARS-CoV-2”. Биологическая часть работы поддержана KU Leuven.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rodríguez-Goncer I., Fernández-Ruiz M., Aguado J.M.* // Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 2020. V. 18. P. 113–125.
2. *Karrer U., Mekker A., Wanke K., Tchang V., Haerberli L.* // Exp. Gerontol. 2009. V. 44. P. 689–694.
3. *Jentzer A., Veyrard P., Roblin X., Saint-Sardos P., Rochereau N., Paul S., Bourlet T., Pozzetto B., Pillet S.* // Microorganisms. 2020. V. 8. P. 1078.
4. *Richardson A.K., Walker L.C., Cox B., Rollag H., Robinson B.A., Morrin H., Pearson J.F., Potter J.D., Pateron M., Surcel H.M., Pukkala E., Currie M.J.* // Clin. Transl. Oncol. 2020. V. 22. P. 585–602.
5. *Ly Y.L., Han F.F., An Z.L., Jia Y., Xuan L.L., Gong L.L., Zhang W., Ren L.L., Yang S., Liu H., Liu L.H.* // Intervirology. 2020. V. 63. P. 10–16.
6. *Plotkin S.A., Boppana S.B.* // Vaccine. 2019. V. 37. P. 7437–7442.
7. *Permar S.R., Schleiss M.R., Plotkin S.A.* // J. Virol. 2018. V. 92. P. e00030–18.
8. *Kotton C.N.* // Curr Opin Organ Transplant. 2019. V. 24. P. 469–475.
9. *Sellar R.S., Peggs K.S.* // Expert Opin. Biol. Ther. 2012. V. 12. P. 1161–1172.
10. *Faure E., Galperine T., Cannesson O., Alain S., Gnemmi V., Goeminne C., Dewilde A., Béné J., Lasri M., Lessore de Sainte Foy C., Lionet A.* // Medicine. 2016. V. 95. P. e5226.
11. *Tan B.H.* // Options Infect. Dis. 2014. V. 6. P. 256–270.

12. El Helou G., Razonable R.R. // *Infect. Drug Resist.* 2019. V. 12. P. 1481–1491.
13. Papanicolaou G.A., Silveira F.P., Langston A.A., Pereira M.R., Avery R.K., Uknis M., Wijatyk A., Wu J., Boeckh M., Marty F.M., Villano S. // *Clin. Infect. Dis.* 2019. V. 68. P. 1255–1264.
14. Piret J., Boivin G. // *Antiviral Res.* 2019. V. 163. P. 91–105.
15. Novikov M.S., Babkov D.A., Paramonova M.P., Khandazhinskaya A.L., Ozerov A.A., Chizhov A.O., Andrei G., Snoeck R., Balzarini J., Seley-Radtke K.L. // *Bioorg. Med. Chem.* 2013. V. 21. P. 4151–4157.
16. Babkov D.A., Khandazhinskaya A.L., Chizhov A.O., Andrei G., Snoeck R., Seley-Radtke K.L., Novikov M.S. // *Bioorg. Med. Chem.* 2015. V. 23. P. 7035–7044.
17. Maruyama T., Kozai S., Yamasaki T., Witvrouw M., Pannecouque C., Balzarini J., Snoeck R., Andrei G., De Clercq E. // *Antivir. Chem. Chemother.* 2003. V. 14. P. 271–279.
18. Maruyama T., Demizu Y., Kozai S., Witvrouw M., Pannecouque C., Balzarini J., Snoecks R., Andrei G., De Clercq E. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2007. V. 26. P. 1553–1558.
19. Novikov M.S., Valuev-Elliston V.T., Babkov D.A., Paramonova M.P., Ivanov A.V., Gavryushov S.A., Khandazhinskaya A.L., Kochetkov S.N., Pannecouque C., Andrei G., Snoeck R., Balzarini J., Seley-Radtke K.L. // *Bioorg. Med. Chem.* 2013. V. 21. P. 1150–1158.
20. Paramonova M.P., Khandazhinskaya A.L., Ozerov A.A., Kochetkov S.N., Snoeck R., Andrei G., Novikov M.S. // *Acta Naturae.* 2020. V. 12. P. 134–139.
21. Paramonova M.P., Snoeck R., Andrei G., Khandazhinskaya A.L., Novikov M.S. // *Mendeleev Commun.* 2020. V. 30. P. 602–603.
22. Baker B.R., Kelley J.L. // *J. Med. Chem.* 1970. V. 13. P. 458–461.

SYNTHESIS OF 1-[ω-(BROMOPHENOXY)ALKYL]-3-NAPHTHALENYLMETHYL DERIVATIVES OF URACIL AND THEIR ANALOGUES AS PROBABLE INHIBITORS OF HUMAN CYTOMEGALOVIRUS REPLICATION

M. P. Paramonova^a, E. S. Gureeva^a, A. A. Ozerova^a, R. Snoeck^b, G. Andrei^b, D. A. Alexandrov^c, A. L. Khandazhinskaya^{d, #}, M. S. Novikova^a, and academician of the RAS S. N. Kochetkov^d

^a Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

^b Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, Herestraat 49 bus 1043, Leuven B-3000, Belgium

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

^d V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: khandazhinskaya@bk.ru

A new series of 1-[ω-(bromophenoxy)alkyl]-uracil derivatives containing naphthalene-1-yl-, naphthalene-2-yl-, 1-brominaphthalene-2-ylmethyl, benzyl and anthracene-9-ylmethyl fragments in position 3 of uracil. Antiviral properties of synthesized compounds against human cytomegalovirus were studied. It was found that the compound, which has a bridge consisting of five methylene groups, has high anti-cytomegalovirus activity in vitro.

Keywords: derivatives, synthesis, antiviral activity, human cytomegalovirus

УДК 571.27

СУБПОПУЛЯЦИОННАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ НК-КЛЕТОК ПРИ ИХ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ С ЦЕЛЬЮ ПОСЛЕДУЮЩЕГО ПРИМЕНЕНИЯ В ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ

© 2023 г. М. А. Стрельцова¹, А. А. Бойко¹, М. О. Устюжанина^{1,2}, А. И. Паламарчук¹,
Н. А. Алексеева¹, Р. А. Величинский¹, Ю. Д. Вавилова¹, М. В. Гречихина¹,
А. М. Сапожников¹, академик РАН С. М. Деев^{1,3}, Е. И. Коваленко^{1,*}

Поступило 10.10.2022 г.

После доработки 14.10.2022 г.

Принято к публикации 14.10.2022 г.

Получение генно-инженерных НК-клеток является одним из развивающихся направлений иммунотерапии. В данной работе проведен анализ субпопуляционной гетерогенности НК-клеток, подвергнутых ретровирусной трансдукции с учетом содержания предшественников адаптивных НК-клеток. Показано, что субпопуляции KIR2DL2/DL3⁺, а также CD57-KIR2DL2/DL3⁺NKG2C⁺ могут быть модифицированы с большей эффективностью, чем соответствующие субпопуляции, не несущие маркеров KIR2DL2/DL3 и NKG2C. После генетической модификации клетки с фенотипом CD57-KIR2DL2/DL3⁺NKG2C⁺ начинали экспрессировать CD57 *de novo*, приобретая типичный для адаптивных НК-клеток фенотип.

Ключевые слова: НК-клетки, иммунотерапия, модификация, трансдукция, адаптивные НК-клетки, пролиферативный потенциал, чувствительность к модификации

DOI: 10.31857/S2686738922700068, **EDN:** MVBLMI

В настоящее время использование генетически модифицированных НК-клеток является перспективной стратегией противоопухолевой иммунотерапии [1]. Однако на пути реализации этой стратегии необходимо преодолеть ряд проблем [2], в частности, получить возможность наработки требуемого количества трансдуцированных НК-клеток. Существует множество субпопуляций НК-клеток, которые могут различаться по пролиферативному потенциалу и восприимчивости к генетической вирусной трансдукции [3]. Поиск сочетания субпопуляционных НК-клеточных маркеров, способных предсказать полу-

чение большего количества трансдуцированных НК-клеток, является актуальной биологической задачей. Использование в иммунотерапии адаптивных НК-клеток, способных атаковать клетки-мишени при повторной встрече с антигенами цитомегаловируса человека (HCMV), представляет перспективным подходом к решению указанной задачи, поскольку такие клетки, наряду с противоопухолевым действием, могут помочь в сдерживании реактивации персистирующего у большинства пациентов вируса HCMV [4]. Типичные адаптивные НК-клетки являются высокодифференцированными, CD57-позитивными, NKG2A-негативными и несут на поверхности рецепторы семейства KIR [5]. Известно, что в процессе дифференцировки НК-клетки, начинающие экспрессировать ингибирующие рецепторы KIR, приобретают “лицензию” на выполнение цитотоксических функций путем распознавания главного комплекса гистосовместимости класса I [6]. Использование субпопуляций адаптивных НК-клеток, прошедших стадию “лицензирования”, может повысить иммунотерапевтическую эффективность НК-клеток. Целью данной работы являлось изучение субпопуляционной гетеро-

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

² Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

³ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

*e-mail: lenkovalen@mail.ru

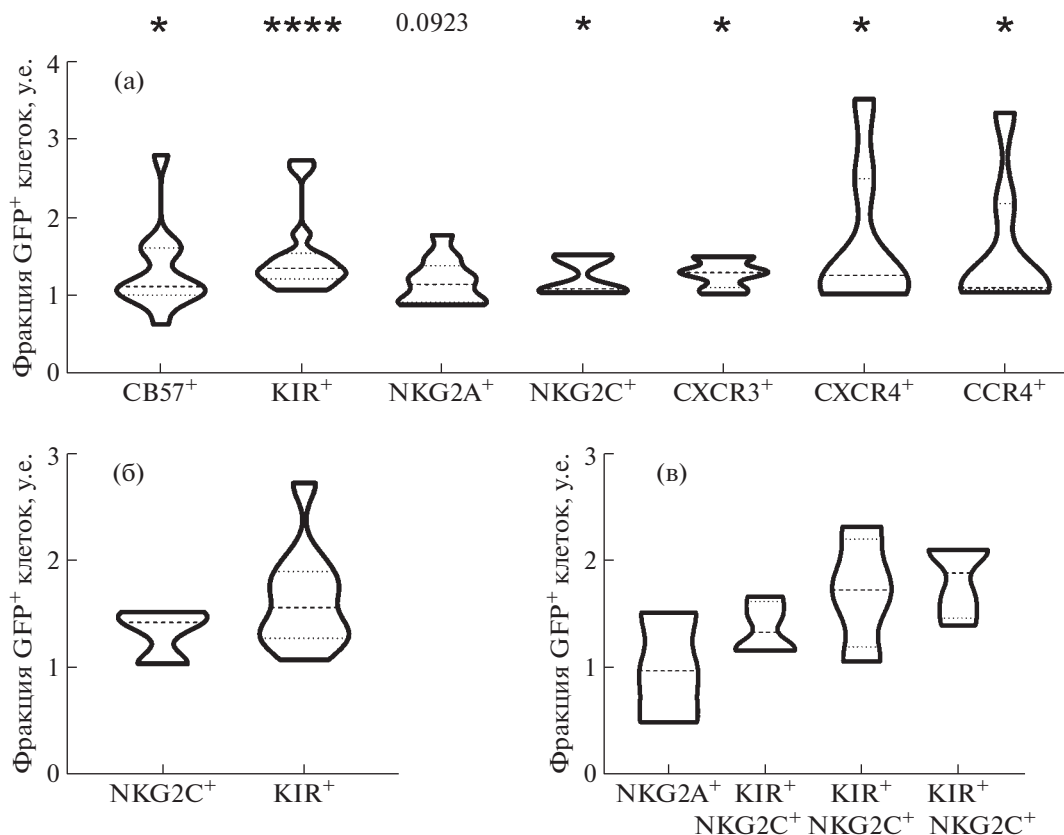


Рис. 1. Сравнение эффективности заражения вирусными частицами различных субпопуляций NK-клеток, измеренное по уровню флуоресценции репортерного белка GFP через 7 дней после процедуры трансдукции. Статистический анализ был проведен с использованием парного Т-теста. (а, б) – Данные нормализованы на уровень экспрессии GFP в соответствующей негативной субпопуляции (у.е. – условные единицы), (а) – данные получены методом гейтирования клеток, $n = 16$. (б, в) – данные по экспрессии GFP получены на клетках, выделенных методом сортировки, (б) – $n = 8$, (в) – $n = 4$.

генности NK-клеток при проведении генетической модификации.

Образцы венозной крови были забраны у здоровых доноров, давших устное информированное согласие на участие в исследовании. Популяцию NK-клеток выделяли с помощью магнитной сепарации из фракции мононуклеаров. Для стимуляции NK-клеток использовали методику культивирования *in vitro* с IL-2 и предварительно облученными модифицированными фидерными клетками K562-mbIL21 [7]. Для модификации использовали ретровирусные частицы, несущие на поверхности белок RD114. Эффективность трансдукции измеряли по уровню экспрессии репортерного белка GFP методом проточной цитофлуориметрии. В работе были проанализированы NK-клетки 16 здоровых добровольцев.

После стимуляции *in vitro* в течение 7 дней большинство NK-клеток экспрессировали маркер активации HLA-DR. Полученные культуры имели низкое содержание клеток CD57⁺ и повышенное NKG2A⁺, что характерно для слабодиф-

ференцированных NK-клеток. Большая часть NK-клеток экспрессировала также активирующие рецепторы CD16 и NKp30. Вместе с низким уровнем CD57 у части стимулированных клеток наблюдалась значительная экспрессия активирующего рецептора NKG2C, маркера специализированной субпопуляции NK-клеток – адаптивных NK-клеток. Предположительно NK-клетки CD57⁺-NKG2C⁺ избирательно пролиферировали в ответ на использованные стимулы. Однако мы не исключаем возможность частичной потери экспрессии CD57 NK-клетками с исходным фенотипом NKG2C⁺CD57⁺, так как на клональном уровне было показано, что высокодифференцированные NK-клетки CD57^{bright} могут утрачивать экспрессию CD57 [8].

Данные по эффективности трансдукции NK-клеток были получены через 7 дней после их заражения вирусными частицами с использованием проточной цитометрии и последующего гейтирования. Так как после трансдукции большинство NK-клеток экспрессировало активирующие ре-

цепторы CD2, CD16, NKG2D и маркер активации HLA-DR, сравнение уровня трансдукции в субпопуляциях, различающихся по экспрессии указанных маркеров, не проводилось.

Поскольку миграционный потенциал НК-клеток в опухоль в значительной степени регулируется хемокинами [9], нами была проведена оценка эффективности трансдукции НК-клеток, экспрессирующих различные хемокиновые рецепторы. Повышенный уровень трансдукции был выявлен у НК-клеток, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CXCR3, CXCR4 и CCR7 (рис. 1а).

Ранее нами была продемонстрирована низкая эффективность трансдукции отсортированных НК-клеток с фенотипом CD57⁺ [10]. Однако при модификации общей популяции НК-клеток большее процентное содержание GFP-позитивных клеток было зарегистрировано в субпопуляции CD57⁺ (рис. 1а) по сравнению с CD57-негативной субпопуляцией. По-видимому, это связано с увеличением экспрессии CD57 НК-клетками после процедуры трансдукции. В то же время увеличенная эффективность ретровирусной модификации была выявлена во фракции НК-клеток с фенотипом NKG2C⁺ (рис. 1а).

Большее процентное содержание GFP⁺ клеток наблюдалось в субпопуляции KIR2DL2/DL3⁺ (KIR⁺) по сравнению с KIR-негативной (рис. 1А). Причиной выявленного различия может быть как более высокая скорость пролиферации KIR⁺НК-клеток после процедуры трансдукции, так и лучшая восприимчивость KIR⁺НК-клеток к ретровирусной модификации. Для выяснения причины указанных различий свежeweделенные НК-клетки были поделены на фракции KIR⁺ и KIR⁻ с помощью клеточной сортировки, простимулированы и подвергнуты ретровирусной трансдукции по вышеописанной методике. Анализ данных показал значительное увеличение эффективности заражения отсортированных НК-клеток субпопуляции KIR⁺, по сравнению с отсортированными НК-клетками из субпопуляции KIR⁻ (рис. 1б). Так как после 7-дневного культивирования трансдуцированных клеток не наблюдалось увеличения доли GFP⁺ в субпопуляции KIR⁺, гипотеза о более высокой скорости пролиферации модифицированных НК-клеток с фенотипом KIR⁺ была исключена. Это позволило сделать вывод о существовании связи между эффективностью трансдукции НК-клеток и уровнем поверхностной экспрессии рецепторов KIR.

Часть НК-клеток с фенотипом CD57⁻NKG2A⁻NKG2C⁺ обладает чертами адаптивных НК-клеток и может являться их предшественниками [11]. В данной работе CD57-негативные НК-клетки были отсортированы с учетом наличия на их поверхности рецепторов NKG2A, NKG2C и

KIR2DL2/3. Показано, что через 7 дней культивирования в субпопуляции CD57⁻KIR⁺NKG2C⁺ значительно большая доля клеток экспрессировала маркер CD57 *de novo* [12]. По-видимому, часть этих НК-клеток является адаптивными клетками, также характеризующимися наличием CD57. Было проведено сравнение эффективности трансдукции отсортированных субпопуляций KIR⁻NKG2C⁺, KIR⁺NKG2C⁻ и KIR⁺NKG2C⁺ (рис. 1В). Наибольшая восприимчивость к модификации зарегистрирована в клетках, полученных из субпопуляции KIR⁺NKG2C⁺.

Полученные данные послужат обоснованием к более четкому выбору субпопуляций НК-клеток для генетической модификации с целью их потенциального использования в таргетной противоопухолевой терапии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Минобрнауки № 075-15-2021-1049.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования с участием людей были рассмотрены и одобрены Российским национальным исследовательским медицинским университетом имени Пирогова. Участники предоставили устное информированное согласие на участие в этом исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tolmachev V.M., Chernov V.I., Deyev S.M. Targeted nuclear medicine. Seek and destroy // Russian Chemical Reviews. 2022. V. 91. RCR5034.
2. Shipunova V.O., Deyev S.M. Artificial scaffold polypeptides as an efficient tool for the targeted delivery of nanostructures in vitro and in vivo // Acta Naturae. 2022. V. 14 (1). P. 54–72.
3. Yang C., Siebert J.R., Burns R., et al. Heterogeneity of human bone marrow and blood natural killer cells defined by single-cell transcriptome // Nature Communications. 2019. V. 10. P. 3931. <https://doi.org/10.1038/S41467-019-11947-7>
4. Hammer Q., Rückert T., Borst E.M., et al. Peptide-specific recognition of human cytomegalovirus strains controls adaptive natural killer cells // Nature Immunology. 2018. V. 19. P. 453–463.
5. Bezjat V., Liu L.L., Malmberg J.A., et al. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs // Blood. 2013. V. 121. P. 2678–2688.
6. Tu M.M., Mahmoud A.B., Makrigiannis A.P. Licensed and Unlicensed NK Cells: Differential Roles in Cancer and Viral Control // Frontiers in Immunology. 2016. V. 7. P. 166.
7. Denman C.J., Senyukov V. V., Somanchi S.S., et al. Membrane-bound IL-21 promotes sustained Ex Vivo

- proliferation of human natural killer cells // PLoS One. 2012. V. 7. P. e30264.
8. *Streltsova M.A., Erokhina S.A., Kanevskiy L.M., et al.* Analysis of NK cell clones obtained using interleukin-2 and gene-modified K562 cells revealed the ability of “senescent” NK cells to lose CD57 expression and start expressing NKG2A // PLoS One. 2018. V. 13. P. e0208469.
 9. *Fauriat C., Long E.O., Ljunggren H.-G., et al.* Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition // Blood. 2010. V. 115. P. 2167–2176.
 10. *Streltsova M.A., Barsov E.V., Erokhina S.A., et al.* Retroviral gene transfer into primary human NK cells activated by IL-2 and K562 feeder cells expressing membrane-bound IL-21 // Journal of Immunological Methods. 2017. V. 450. P. 90–94.
 11. *Kobyzeva P.A., Streltsova M.A., Erokhina S.A., et al.* CD56dimCD57–NKG2C+ NK cells retaining proliferative potential are possible precursors of CD57+NKG2C+ memory-like NK cells // Journal of Leukocyte Biology. 2020. V. 108. P. 1379–1395.
 12. *Pfefferle A., Jacobs B., Ask E.H., et al.* Intra-lineage Plasticity and Functional Reprogramming Maintain Natural Killer Cell Repertoire Diversity // Cell Reports. 2019. V. 29. P. 2284–2294.

SUBPOPULATION HETEROGENEITY OF NK CELLS DURING THE GENETIC MODIFICATION FOR SUBSEQUENT USE IN TARGETED THERAPY

**M. A. Streltsova^a, A. A. Boyko^a, M. O. Ustiuzhanina^{a,b}, A. I. Palamarchuk^a,
N. A. Alekseeva^a, R. A. Velichinskii^a, J. D. Vavilova^a, M. V. Grechikhina^a, A. M. Sapozhnikov^a,
Academician of the RAS S. M. Deev^{a,c}, and E. I. Kovalenko^{a,#}**

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

^b Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russian Federation

^c I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

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

Obtaining genetically engineered NK cells is one of the developing areas of immunotherapy. In this work, we analyzed the subset heterogeneity of NK cells subjected to retroviral transduction, taking into account the content of adaptive NK cell precursors. It has been shown that subpopulations of KIR2DL2/DL3⁺, as well as CD57–KIR2DL2/DL3⁺NKG2C⁺, can be modified with greater efficiency than the corresponding subpopulations that do not carry the KIR2DL2/DL3 and NKG2C markers. After genetic modification, the CD57–KIR2DL2/DL3⁺NKG2C⁺ cells began to express CD57 *de novo*, acquiring the adaptive NK cell phenotype.

Keywords: NK cells, immunotherapy, modification, transduction, adaptive NK cells, proliferative potential, sensitivity to modification

УДК 577.115.3 + 577.359

СОДЕРЖАНИЕ ДОКОЗАГЕКСАЕНОВОЙ КИСЛОТЫ В ГРУДНЫХ МЫШЦАХ ПТИЦ СВЯЗАНО С ЧАСТОТОЙ ВЗМАХОВ КРЫЛЬЕВ

© 2023 г. Член-корреспондент РАН М. И. Гладышев^{1,2,*}

Поступило 12.10.2022 г.
После доработки 20.10.2022 г.
Принято к публикации 20.10.2022 г.

Докозагексаеновая кислота (22: 6n–3, ДГК), являясь структурным компонентом клеточных мембран, за счет особой формы своей молекулы создает высокое латеральное давление, повышая тем самым активность мембраносвязанных ферментов. Вероятно, высокое содержание ДГК способствует высокой частоте сокращения и длительному периоду работы скелетных мышц. Для оценки возможной физиолого-биохимической роли ДГК в мышечной ткани была проверена связь ее содержания в грудных мышцах различных видов птиц с частотой взмахов крыльев. Обнаружена высокая статистически достоверная корреляция между содержанием ДГК в грудных мышцах птиц и видоспецифичной частотой взмахов их крыльев.

Ключевые слова: полиненасыщенные жирные кислоты омега-3, эссенциальные компоненты питания, отряд Воробьинообразные

DOI: 10.31857/S2686738922600741, **EDN:** MPTMZM

Длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты семейства омега-3, в том числе докозагексаеновая кислота (22:6n–3, ДГК), как известно, относятся к числу важнейших компонентов питания многих всеядных позвоночных животных, включая человека [1]. ДГК является основной жирной кислотой в составе фосфолипидов мембран нервных клеток, включая клетки коры головного мозга и сетчатки глаза, а также биохимическим предшественником и регулятором синтеза сигнальных молекул (эндогормонов) [2]. Кроме того, ДГК считается “пейсмекером” (pacemaker) – водителем ритма, задающим темп биохимических реакций, протекающих в мембранах клеток мышц, поскольку ее молекула с шестью двойными связями, фактически закрученная в спираль, имеет низкие потенциальные барьеры вращения и создает в липидном бислое высокое латеральное давление, повышая тем самым активность мембраносвязанных ферментов [3]. Вероятно, высокое содержание ДГК в скелетных мышцах способствует высокой частоте их сокращения и длительному периоду работы [4].

Действительно, например, у различных видов рыб содержание ДГК в мышцах тем выше, чем выше скорость их плавания [5]. У птиц содержание ДГК связывают с их размером, от которого зависит скорость основного обмена [3]. Однако частота сокращения мышц может оказаться более важной функцией, требующей высокого уровня ДГК, чем скорость общего метаболизма. Например, в грудных и ножных мышцах колибри, имеющих разную частоту сокращения, уровень ДГК различался более чем в 4 раза [4]. Логично предположить, что содержание ДГК в грудных мышцах у различных видов птиц может быть связано с видоспецифичной частотой взмахов крыльев. Таким образом, целью данной работы была проверка возможной связи содержания ДГК в грудных мышцах различных видов птиц с частотой взмахов крыльев.

Данные о содержании ДГК в грудных мышцах 14 видов птиц были взяты из работы [6]. Частота взмахов крыльев для этих видов приведена в работах [7–11]. На основе обобщенных данных (табл. 1), предварительно проверенных на нормальность распределения по критерию Колмогорова–Смирнова, был рассчитан коэффициент корреляции, оказавшийся статистически достоверным: $r = 0.80$, $p < 0.05$. Графическое отображение вероятной связи содержания ДГК в грудных мышцах и видоспецифичной частоты взмахов крыльев представлено на рис. 1.

¹ Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук, Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр СО РАН”, Красноярск, Россия

² Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

*e-mail: glad@ibp.ru

Таблица 1. Частота взмахов крыльев (Гц) и содержание докозагексаеновой кислоты (ДГК, мг/г сырой массы) у различных видов птиц по литературным данным [6–11]

Вид	Частота взмахов	ДГК
Цапля серая (<i>Ardea cinerea</i>)	2.8	0.6
Крячка речная (<i>Sterna hirundo</i>)	3.1	0.7
Чайка озерная (<i>Larus ridibundus</i>)	3.4	0.4
Улит большой (<i>Tringa nebularia</i>)	5.2	0.3
Голубь сизый (<i>Columba livia</i>)	6.6	0.2
Горлица большая (<i>Streptopelia orientalis</i>)	7.1	0.2
Ласточка деревенская (<i>Hirundo rustica</i>)	7.4	2.4
Чомга (<i>Podiceps cristatus</i>)	8.5	0.2
Скворец обыкновенный (<i>Sturnus vulgaris</i>)	11.3	1.5
Трясогузка белая (<i>Motacilla alba</i>)	16.1	1.8
Овсянка тростниковая (<i>Emberiza schoeniclus</i>)	18.2	2.4
Камышовка барсучок (<i>Acrocephalus schoenobaenus</i>)	18.9	3.5
Трясогузка желтая (<i>Motacilla flava</i>)	19.2	2.3
Воробей полевой (<i>Passer montanus</i>)	29.0	2.8

Таким образом, впервые доказано, что содержание ДГК в грудных мышцах птиц тем выше, чем выше видоспецифичная частота взмахов их крыльев. Данный результат хорошо согласуется с современными представлениями о роли ДГК в мышцах как “пейсмейкеров” биохимических реакций, протекающих в клеточных мембранах. Наряду с физиолого-биохимической значимо-

стью, уровень ДГК в биомассе тех или иных организмов как звеньев трофических сетей является важнейшим параметром, определяющим качество потоков органического вещества в природных экосистемах, или, иными словами, качество биологической продукции [12].

Следует отметить, что уровень ДГК в грудных мышцах птиц отр. Воробьинообразных, для которых характерна высокая частота взмахов крыльев, оказался достоверно выше, чем у водоплавающих и околоводных представителей других отрядов [6]. Хотя известно, что уровень базального метаболизма Воробьинообразных почти в полтора раза выше, чем у птиц других таксонов [13], содержание метаболического “пейсмейкера” ДГК именно в грудных мышцах все же связывают в первую очередь не с общим уровнем метаболизма, а с частотой их сокращения при полете [4].

Водные и околоводные птицы, очевидно, питаются продукцией водных экосистем, богатой ДГК, тогда как большинство Воробьинообразных питаются на суше, где нет прямых источников ДГК, и даже наземные имаго амфибионтных насекомых содержат незначительное количество этой жирной кислоты [14]. Вероятно, Воробьинообразные синтезируют ДГК, необходимую им для роста, развития и нормального функционирования, из альфа-линоленовой (18:3 n –3) и эйкозапентаеновой кислоты (20:5 n –3), которой богаты такие их объекты питания, как имаго амфибионтных насекомых [14–16]. Именно грудные мышцы составляют основную часть съедобной биомассы птиц, доступной для последующих трофических уровней. То есть экологическая роль птиц как звеньев трофических сетей природных экоси-

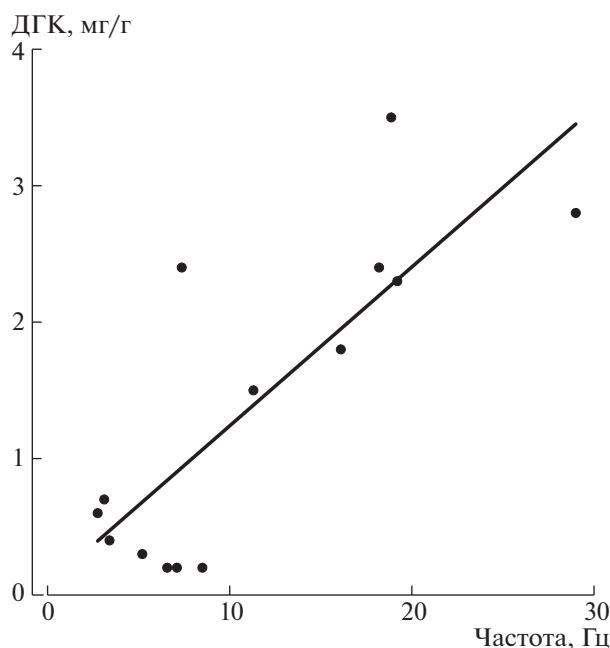


Рис. 1. Зависимость между содержанием докозагексаеновой кислоты (ДГК) в грудных мышцах и частотой взмахов крыльев различных видов птиц. Прямая линия является линейной аппроксимацией.

стем, через которые происходит передача эссенциальных компонентов питания, а именно ДГК, зависит не только от их пищевых источников, но и от их физиологических особенностей, в том числе в значительной степени — от видоспецифичной частоты взмахов крыльев.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Simopoulos A.P. // *Poult. Sci.* 2000. V. 79. P. 961–970.
2. Calder P.C. // *Proc. Nutr. Soc.* 2018. V. 77. P. 52–72.
3. Hulbert A.J. // *Lipids.* 2007. V. 42. P. 811–819.
4. Infante J.P., Kirwan R.C., Brenna J.T. // *Compar. Biochem. Physiol. B.* 2001. V. 130. P. 291–298.
5. Gladyshev M.I., Sushchik N.N., Tolomeev A.P., Dgebuadze Y.Y. // *Rev. Fish Biol. Fisheries* 2018. V. 28. P. 277–299.
6. Gladyshev M.I., Popova O.N., Makhutova O.N., et al. // *Contemp. Probl. Ecol.* 2016. V. 9. P. 503–513.
7. Puranik P.G., Gopala Krishna G., Ahmed A. // *Proc. Indian Acad. Sci.* 1977. V. 85B. P. 327–339.
8. Pennycuik C.J. // *J. Exp. Biol.* 1990. V. 150. P. 171–185.
9. Nudds R.L., Taylor G.K., Thomas A.L.R. // *Proc. R. Soc. Lond. B.* 2004. V. 271. P. 2071–2076.
10. Schmidt-Wellenburg C.A., Biebach H., Daan S., Visser G.H. // *J. Comp. Physiol. B.* 2007. V. 177. P. 327–337.
11. Bruderer B., Peter D., Boldt A., Liechti F. // *Ibis.* 2010. V. 152. P. 272–291.
12. Dgebuadze Y.Y., Gladyshev M.I. // *Contemp. Probl. Ecol.* 2016. V. 9. P. 391–395.
13. Гаврилов В.М. // Доклады Академии наук. 2000. Т. 371. № 2. С. 269–273.
14. Gladyshev M.I., Sushchik N.N. // *Biomolecules.* 2019. V. 9. Paper No. 485. <https://doi.org/10.3390/biom9090485>
15. Twining C.W., Brenna J.T., Lawrence P., et al. // *PNAS USA.* 2016. V. 113. P. 10920–10925.
16. Pilecky M., Zavorka L., Arts M.T., Kainz M.J. // *Biol. Rev.* 2021. V. 96. P. 2127–2145.

CONTENT OF DOCOSAHEXAENOIC ACID IN PECTORAL MUSCLES OF BIRDS CORRELATES WITH WING BEAT FREQUENCY

Corresponding Member of RAS M. I. Gladyshev^{a,b,#}

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

^b Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

[#]e-mail: glad@ibp.ru

Docosahexaenoic acid (22:6n–3, DHA) is a structural component of cell membranes and due to a peculiar form of its molecule exerts a high lateral pressure in the membranes enhancing activity of membrane-associated enzymes. A high content of DHA probably provides a high frequency of contraction and a continuous working of skeletal muscles. To estimate the probable physiological and biochemical role of DHA in muscle tissue, a relation of its contents in pectoral muscles of birds with wing beat frequency was evaluated. A high statistically significant correlation between the content of DHA in pectoral muscles of birds and species-specific wing beat frequency was found.

Keywords: polyunsaturated fatty acids omega-3, essential components of diet, order Passeriformes

УДК 577.35.577.345

СИНЕРГИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ТАРГЕТНОЙ И ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ В ОТНОШЕНИИ HER2-ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2023 г. И. В. Балалаева^{1,*}, Л. В. Крылова¹, М. А. Карпова¹, А. А. Шульга²,
Е. В. Коновалова², Е. Л. Гурьев¹, академик РАН С. М. Деев^{2,3,**}

Поступило 10.10.2022 г.

После доработки 25.10.2022 г.

Принято к публикации 25.10.2022 г.

Перспективной стратегией по повышению эффективности противоопухолевой терапии является разработка комбинированных схем лечения онкологических заболеваний. В работе показана принципиальная возможность многократного усиления противоопухолевого действия при комбинировании таргетной и фотодинамической терапии. Продemonстрировано, что последовательная обработка клеток HER-2 положительного рака молочной железы таргетным токсином DARPIn-LoPE и фотоактивным соединением фотодитазин приводит к многократному синергическому усилению их эффекта. В перспективе такой подход призван обеспечить достижение максимального терапевтического эффекта при минимизации рисков негативных побочных эффектов.

Ключевые слова: таргетная терапия, рекомбинантный противоопухолевый токсин, DARPIn-LoPE, фотодинамическая терапия, фотодитазин, рак молочной железы, рецептор HER2

DOI: 10.31857/S268673892270007X, EDN: MUGOWP

Рак молочной железы (PMЖ) является наиболее распространенным онкологическим заболеванием среди женщин [1]. При лечении данного заболевания широко используется лекарственная терапия, однако традиционные химиопрепараты зачастую демонстрируют недостаточную терапевтическую эффективность и высокую системную токсичность. Достижения в области молекулярной биологии способствовали созданию более эффективного и прецизионного подхода к лечению онкологических заболеваний — таргетной терапии. Таргетная терапия основана на применении агентов, специфически взаимодействующих с определенными молекулярными мишенями опухолевой клетки, что приводит к остановке пролиферации и распространения опухоли [2, 3].

Примерно 30% случаев PMЖ характеризуются сверхэкспрессией рецептора эпидермального фактора роста человека 2 (HER-2, от англ. Human Epidermal growth factor Receptor 2), связанного со злокачественной трансформацией клеток [4]. Для лечения данного подтипа рака в настоящее время в клинике применяются таргетные препараты на основе моноклональных антител, скаффолдов и их конъюгатов (трастузумаб, пертузумаб, TDM1 и др.) и низкомолекулярный ингибитор (лапатиниб) [5, 6]. Важнейшим исследовательским направлением является разработка рекомбинантных белковых агентов, в которых в единую полипептидную цепь объединены направляющий белок и фрагмент токсина растительного или бактериального происхождения. Селективное действие таких таргетных токсинов в отношении опухолевых клеток очень высоко, существует точка зрения, согласно которой для гибели клетки достаточно поступления в нее единичных молекул токсина. К таким перспективным агентам относится таргетный токсин DARPIn-LoPE. Включенный в его состав белок из группы дарпинов DARPIn9.29 обеспечивает высокоаффинное специфическое связывание с внеклеточным доменом HER2, цитотоксический эффект реализуется за счет низкомуногенного фрагмента псевдомонадного экзотоксина A LoPE, который не-

¹ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

² Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

³ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

*e-mail: irin-b@mail.ru

**e-mail: biomet@mail.ru

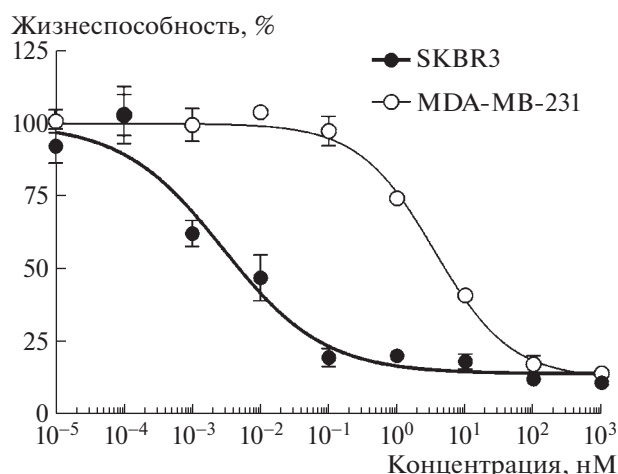


Рис. 1. Зависимость относительной жизнеспособности клеток SK-BR-3 и MDA-MB-231 от концентрации таргетного токсина DARPIn-LoPE. Клетки инкубировали с токсином в течение 48 ч, затем среду заменяли полной ростовой средой. Жизнеспособность клеточных культур оценивали через 24 ч при помощи МТТ-теста.

обратимо блокирует синтез белка в клетке на уровне трансляции [7, 8].

Несмотря на многочисленные достоинства таргетной терапии, ее применение в качестве монотерапевтического подхода имеет ограниченную эффективность из гетерогенности клеток опухоли и формирования ими приобретенной лекарственной устойчивости [9]. В связи с этим в последние десятилетия большинство исследований направлено на разработку комбинированных терапевтических подходов, подразумевающих сочетание или последовательное применение нескольких, различных по механизму действия, терапевтических агентов. В результате комбинации могут наблюдаться аддитивный или синергический эффект при сниженной терапевтической дозе каждого индивидуального компонента [10, 11]. В качестве одной из таких схем рассматривается комбинация таргетной терапии и фотодинамической терапии (ФДТ). Привлекательность ФДТ для исследователей заключается в минимальной инвазивности и низкой токсичности в отношении нормальных клеток. Терапевтический эффект ФДТ основан на взаимодействии фотоактивного вещества, или фотосенсибилизатора, в возбужденном состоянии и молекулярного кислорода, которое приводит к образованию активных форм кислорода (АФК). В результате избыточной продукции АФК в клетке-мишени происходит запуск окислительного стресса и последующей гибели [12–14].

В данной работе мы исследовали терапевтический потенциал комбинации рекомбинантного токсина DARPIn-LoPE и ФДТ в отношении

HER2-положительного рака молочной железы *in vitro*.

Специфическая цитотоксичность DARPIn-LoPE была подтверждена путем сравнения его действия в отношении клеток аденокарциномы молочной железы человека двух линий, а именно SK-BR-3, характеризующихся сверхэкспрессией HER2, и MDA-MB-231 с очень низким уровнем представленности данного рецептора. Согласно данным проточной цитометрии с использованием специфических антител к данному рецептору, представленность HER2 в культуре клеток SK-BR-3 на три порядка выше по сравнению с MDA-MB-231.

С использованием МТТ-теста показано, что DARPIn-LoPE снижает жизнеспособность клеток SK-BR-3 при крайне низких концентрациях (рис. 1). При инкубации с токсином в течение 48 ч значение полумаксимальной ингибирующей концентрации IC_{50} составило 2.8 нМ (95% доверительный интервал 1.4–5.7 нМ). В отношении клеток MDA-MB-231 таргетный токсин оказался существенно менее токсичным, значение IC_{50} составило 3.6 нМ (2.6–4.9 нМ). Высокая эффективность действия DARPIn-LoPE в отношении клеток SK-BR-3, на три порядка превосходящая таковую для MDA-MB-231, по-видимому, обусловлена высокоспецифичным взаимодействием направляющего модуля (DARPIn) с рецептором HER2, экспрессия которого на клетках данной линии также на три порядка выше.

Использование для лечения опухолей высоких концентраций рекомбинантных противоопухолевых токсинов сопряжено с риском развития серьезных побочных эффектов. В случае производных псевдомонадного экзотоксина А они связаны в первую очередь с гепатотоксичностью и кардиотоксичностью [15]. Мы полагаем, что снижение негативного влияния на нормальные ткани и органы при лечении HER2-положительного РМЖ возможно путем использования подхода, при котором терапия с относительно низкими концентрациями противоопухолевого токсина комбинируется с ФДТ. Возможность такого подхода была показана нами экспериментально.

Для проведения ФДТ применялся коммерчески доступный препарат фотодитазин, или ФД (ООО ВЕТА-ГРАНД, Россия), представляющий собой бис-N-метилглюкаминовую соль хлорина еб. Исследование фотодинамической активности ФД проводилось на клеточной культуре SK-BR-3. Клетки инкубировали с ФД в течение 4 ч, а затем проводили облучение в дозе 20 Дж/см² (32 мВт/см², 10 мин 25 с) в спектральном диапазоне 655–675 нм при помощи светодиодного излучателя [16] в термостатируемых условиях (37°C). Фотодинамическое воздействие приводило к фотоиндуцированной гибели клеток со значением IC_{50} 0.64 мкМ (0.44–0.95 мкМ), тогда как в отсут-

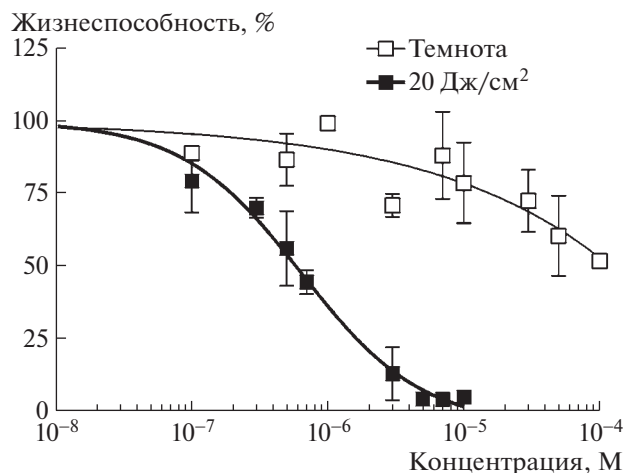


Рис. 2. Зависимость относительной жизнеспособности клеток SK-BR-3 от концентрации фотодитазина в темноте и при освещении в дозе 20 Дж/см². Клетки инкубировали с фотосенсибилизатором в течение 4 ч, затем заменяли среду полной ростовой средой. Для оценки фотодинамического воздействия клетки облучали с помощью светодиодного облучателя. Жизнеспособность клеточных культур оценивали через 24 ч при помощи МТТ-теста.

ствие облучения жизнеспособность культуры не снижалась ниже 50% даже при концентрациях 100 мкМ ФД (рис. 2).

Реализация комбинированного действия таргетной и фотодинамической терапии проводилась путем последовательной обработки клеток SK-BR-3 DARPin-LoPE и фотодитазина с последующим облучением (рис. 3 а). Применение двух терапевтических агентов в дозах, приближенных к значениям IC₅₀ (2 пМ DARPin-LoPE и 0.5 мкМ ФД), показало значительное увеличение эффективности воздействия по сравнению с монотерапевтическими вариантами. При такой обработке жизнеспособность культуры клеток не превышала 10% (рис. 3 б).

Идеальной ситуацией при использовании нескольких терапевтических агентов считается появление синергического эффекта, при котором эффективность действия комбинации агентов превосходит простую сумму эффектов индивидуальных соединений. В таком случае для достижения конечного результата, в нашем случае полной элиминации опухолевых клеток, можно использовать меньшие концентрации терапевтических агентов, что существенно снижает нагрузку на нормальные ткани и органы. Особенно актуально достижение синергизма в случае использования соединений с высоким риском развития побочных эффектов.

Для выяснения, является ли совместное действие DARPin-LoPE и ФД аддитивным или синергическим, мы провели серию экспериментов, в которых оценивали эффективность их сочетан-

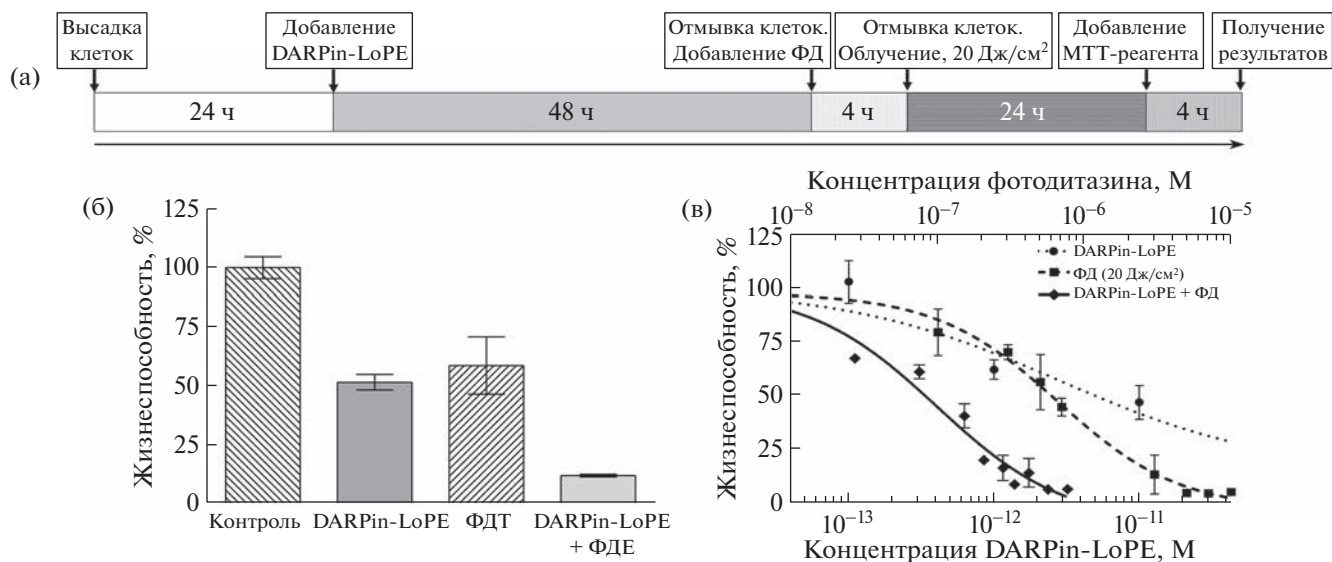


Рис. 3. Сочетанное действие DARPin-LoPE и фотодитазина (20 Дж/см²) на клетки SK-BR-3. а — схема эксперимента по оценке сочетанного действия *in vitro*. Клетки инкубируются с DARPin-LoPE в течение 48 ч, после чего отмываются и инкубируются с ФД в течение 4 ч с последующим облучением в дозе 20 Дж/см², оценка эффекта осуществляется через сутки с использованием МТТ-теста. б — относительная жизнеспособность клеток при обработке DARPin-LoPE и ФД индивидуально, а также при их комбинации в дозах, соответствующих IC₅₀. в — кривые доза-эффект для DARPin-LoPE, ФД (20 Дж/см²) и их сочетанного воздействия; соотношение концентраций действующих веществ при всех вариантах сочетанной обработки сохранялось неизменным.

ного действия в разных концентрациях, но при сохранении одного и того же соотношения между агентами (1:250), соответствующего соотношению их IC_{50} (рис. 3 в). Комбинирование двух видов воздействия позволило добиться существенного снижения жизнеспособности культуры SK-BR-3 при концентрациях токсина и фотосенсибилизатора, практически нетоксичных для клеток при их использовании по отдельности. Полученные кривые доза-эффект были использованы для расчета комбинаторного индекса CI [17]. Данный индекс предназначен для определения типа лекарственного взаимодействия, значения CI в диапазоне 0.9–1.1 соответствуют аддитивному эффекту, тогда как $CI < 0.9$ свидетельствует о синергическом усилении действия агентов. Рассчитанное значение CI для комбинации DARPIn-LoPE и ФД составило 0.07, что свидетельствует о значительном синергическом эффекте при их совместном применении.

Мы полагаем, что данный эффект обусловлен особенностями действия исследованных агентов. Предобработка клеток таргетным токсином DARPIn-LoPE приводит к блокаде синтеза белка в клетках-мишенях, в том числе белков системы антиоксидантной защиты, репарации ДНК и ферментов, участвующих в поддержании липидного состава мембран. Такое ингибирование белкового синтеза многократно повышает чувствительность клеток к последующему фотодинамическому воздействию, эффект которого в первую очередь связан с накоплением в клетке окислительных повреждений. Стоит отметить, что сенсибилизация к фотодинамическому воздействию была также показана в отношении низкомолекулярных ингибиторов рецепторных тирозинкиназ [18] и терапевтических моноклональных антител [19]. Это подтверждает перспективность подхода, основанного на комбинировании таргетной и фотодинамической терапии.

В настоящей работе показана принципиальная возможность повышения эффективности лечения HER2-положительного рака молочной железы путем комбинирования таргетной терапии с использованием рекомбинантного токсина DARPIn-LoPE и фотодинамической терапии с фотодитазином. Предлагаемый подход обеспечивает высокоэффективную элиминацию опухолевых клеток за счет значительного синергического эффекта двух действующих агентов. В перспективе такой подход должен обеспечить возможность достижения требуемого терапевтического эффекта при использовании относительно невысоких доз действующих веществ и снижение вероятности развития негативных побочных эффектов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Центр коллективного пользования "Биоорганика" Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова за предоставление возможности проведения экспериментов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект 19-14-00112) в части получения рекомбинантного токсина и РНФ (проект 19-74-20168) в части исследований эффективности комбинированной терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harbeck N., Penault-Llorca F., Cortes J., et al. // Nature Reviews Disease Primers. 2019. V. 5. № 66.
2. Gerber D.E. // American Family Physician. 2008. V. 77. № 3. P. 311–319.
3. Padma V.V. // Biomedicine (Taipei). 2015. V. 5. № 4. P. 19.
4. Iqbal N., Iqbal N. // Molecular Biology International. 2014.
5. Higgins M.J., Baselga J. // Journal of Clinical Investigation. 2011. V. 121. № 10. P. 3797–3803.
6. Tolmachev V.M., Chernov V.I., Deyev S.M. // Russ. Chem. Rev. 2022. V. 91. RCR5034.
7. Sokolova E.A., Shilova O.N., Kiseleva D.V., et al. // International Journal of Molecular Sciences. 2019. V. 20. № 10.
8. Shapira A., Benhar I. // Toxins (Basel). 2010. V. 2. № 11. P. 2519–2583.
9. Sabnis A.J., Bivona T.G. // Trends in Molecular Medicine. 2019. V. 25. № 3. P. 185–197.
10. Plana D., Palmer A.C., Sorger P.K. // Cancer Discovery. 2022. V. 12. № 3. P. 606–624.
11. Boshuizen J., Peeper D.S. // Molecular Cell. 2020. V. 78. № 6. P. 1002–1018.
12. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A. et al. // CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2011. V. 61. № 4. P. 250–281.
13. Shramova E.I., Chumakov S.P., Shipunova V.O., et al. // Light Sci. Appl. 2022. V. 11. № 1. P. 38.
14. Mishchenko T., Balalaeva I., Gorokhova A., et al. // Cell Death & Disease. 2022. V. 13. № 5. P. 455.
15. Weldon J.E., Pastan I. // The FEBS Journal. 2011. V. 278. № 23. P. 4683–4700.
16. Shilyagina N.Y., Plekhanov V.I., Shkunov I.V. et al. // Sovremennye Tehnologii v Medicine. 2014. V. 8. P. 15–24.
17. Guryev E.L., Volodina N.O., Shilyagina N.Y., et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2018. V. 115. № 39. P. 9690–9695.
18. Chu P.L., Shihabuddeen W.A., Low K.P., et al. // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2019. V. 27. P. 367–374.
19. Bhuvaneswari R., Ng Q.F., Thong P.S., Soo K.C. // Oncotarget. 2015. V. 6. № 15. P. 13487–13505.

SYNERGISTIC EFFECT OF THE COMBINED ACTION OF TARGETED AND PHOTODYNAMIC THERAPY ON HER2-POSITIVE BREAST CANCER

I. V. Balalaeva^{a,#}, L. V. Krylova^a, M. A. Karpova^a, A. A. Shulga^b, E. V. Konovalova^b,
E. L. Guryev^a, and Academician of the RAS S. M. Deyev^{b,c,##}

^a Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

^b Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^c I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: irin-b@mail.ru

^{##}e-mail: biomem@mail.ru

Development of combined schemes for the treatment of oncological diseases is a promising strategy to improve the effectiveness of antitumor therapy. This paper shows the fundamental possibility of multiplying the antitumor effect by combining targeted and photodynamic therapy. It has been demonstrated that sequential treatment of HER-2 positive breast cancer cells with the targeted toxin DARPIn-LoPE and the photoactive compound Photodithazine leads to a synergistic enhancement of their effect. In the future, this approach is intended to achieve the maximum therapeutic effect while minimizing the risks of negative side effects.

Keywords: targeted therapy, recombinant anticancer toxin, DARPIn-LoPE, photodynamic therapy, Photodithazine, breast cancer, receptor HER2

УДК 615.32.547.918

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ВЕРОЯТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ АЛКАЛОИДОВ ТРИПТАНТРИНА И МОСТОТРИНА

© 2023 г. А. М. Попов^{1,*}, Л. Г. Деженкова², Т. В. Московкина³, Н. Э. Грамматикова²,
А. С. Кузьмич¹, О. В. Черников¹, А. Е. Щекотихин², академик РАН В. А. Стоник¹

Поступило 10.10.2022 г.

После доработки 25.10.2022 г.

Принято к публикации 25.10.2022 г.

Алкалоид триптантрин и его водорастворимое производное мостотрин проявляют высокую противомикробную и противоопухолевую активность. Для разработки более активных и менее токсичных препаратов были выполнены синтезы и произведено тестирование биологических активностей ряда новых и/или малоизученных их аналогов. Показано, что некоторые из них обладают более высокой цитотоксичностью в отношении опухолевых и микробных клеток, чем триптантрин и мостотрин. Так, 8-фтортриптантрин эффективно ингибирует пролиферацию различных линий опухолевых клеток, а именно: К-562/4, НСТ-116 и НСТ-116p53ko в более низких концентрациях, чем триптантрин, а 2,8-диформостотрин проявляет более сильное противомикробное действие против патогенной бактерии *S. aureus* ATCC 29213, чем мостотрин. Установлено, что антипролиферативные свойства 8-фтортриптантрин и 8-формостотрина связаны с их способностью в наномолярных концентрациях ингибировать клеточный цикл опухолевых клеток на стадии перехода с фазы G₁ в S фазу. Полученные данные свидетельствуют о перспективности проведения дальнейших углубленных исследований их противоопухолевых свойств.

Ключевые слова: производные хиназолиновых алкалоидов, синтез, антипролиферативная активность, противомикробное действие, блокирование клеточного цикла

DOI: 10.31857/S2686738922600807, **EDN:** MTHALD

Алкалоид триптантрин (**1a**) был найден в некоторых высших растениях и микроорганизмах [1] и синтезирован несколькими способами [1–3]. Он обладает противовоспалительными, противотуберкулезными, противопаразитарными, противомикробными свойствами [2] и ингибирует репликацию коронавируса [4]. Изучено также противоопухолевое действие этого вещества, а молекулярный механизм такой активности предположительно связан со способностью блокировать прогрессию и дифференциацию опухолевых клеток [5]. В составе экстрактов медицинских

растений **1a** применяется в медицине, например для лечения псориаза [6]. В то же время плохая биодоступность (он плохо растворим в воде и биологических жидкостях), относительно высокая токсичность и иммуносупрессорные свойства тормозят клиническое применение триптантрин. Поэтому проводится поиск его новых природных и синтетических производных и аналогов с улучшенными биологическими свойствами [1, 2].

Для решения этой задачи недавно был синтезирован его водорастворимый аналог, названный мостотрином (**2a**). Было показано, что (**2a**) является менее токсичным соединением, обладает выраженными противоопухолевыми свойствами в опытах *in vivo* в отношении мышинной модели асцитной карциномы Эрлиха, обеспечивая 50% выживание экспериментальных животных при монотерапии, а при сочетанном применении с известным противоопухолевым антибиотиком доксорубицином, эффективность лечебного курса достигает 100% [7].

Мы синтезировали несколько новых или малоизученных производных триптантрин и мостотрина (**1b**, **1в**, **2b**, **2в**), а также аналог мостотрина на

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

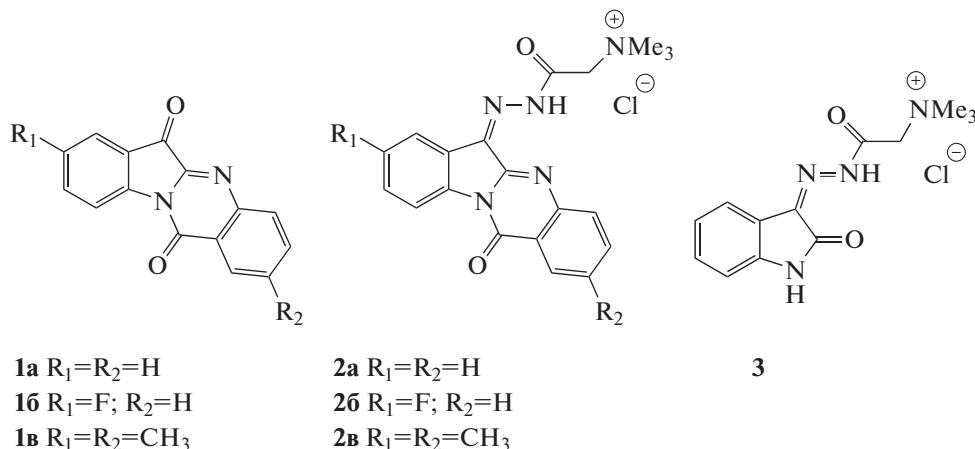
² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, Россия

³ Дальневосточный Федеральный университет, Школа наукоемких технологий и передовых материалов, Русский остров, бухта Аякс, 10, Владивосток, Россия

*e-mail: popovam@piboc.dvo.ru

основе изатина (**3**) и изучили эффективность их ингибирующего действия с использованием раз-

личных культур опухолевых клеток и патогенных микроорганизмов *in vitro*.



Ранее известные замещенные триптантрины (**1b** и **1в**) были получены реакцией 5-фторизатина с изатовым ангидридом при катализе триметиламином [8] и соответственно окислением 5-метилизатина $KMnO_4$, как описано в работе [3], а идентифицированы сравнением их температур плавления и ЯМР спектров с литературными данными. Новые производные мостотрина **2b**, выход 55%, т.пл. $>250^\circ C$ (с разл.) и **2в**, выход 62%, т.пл. $>255^\circ C$ (с разл.) синтезированы по модифицированной методике, ранее использованной нами для получения мостотрина [7]. Строение **2b** и **2в** было подтверждено ИК, масс-спектрами и 1H ЯМР спектрами. Так, в ИК спектре **2b** (Vertex 70, KBr) имелись полосы поглощения, подтверждающие присутствие CO (1690 см^{-1}), NH ($\sim 3480\text{ см}^{-1}$) и C=N групп ($\sim 1610\text{ см}^{-1}$). В масс-спектре **2b**, полученном ВЭЖХ-МС с регистрацией катионов на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 6510, колонка Eclipse XDB-C18, система AcCN– H_2O (7:3), имелся пик M–Cl $^-$ иона с m/z 380.1533 (ВУ 14.7 мин), рассчитано для $C_{20}H_{19}FN_5O_2$ 380.1500. В его DEPT ЯМР спектре (D_2O) присутствовали сигналы 7 ароматических CH, из них три – в виде дублетов из-за ^{13}C – ^{19}F спин-спинового взаимодействия [9], и синглет 9 метильных групп в $N(CH_3)_3$ фрагменте при 54.2 м.д. В ИК спектре **2в** имелись полосы поглощения, подтверждающие присутствие CO (1688 см^{-1}), NH (3484 см^{-1}) и C=N групп (1605 см^{-1}). В масс-спектре **2в** имелся пик катиона с m/z 390.1941, рассчитано для $C_{22}H_{24}N_5O_2$ 390.1925. В его DEPT ЯМР спектре (D_2O) присутствовали сигналы 6 ароматических CH при 115.6, 120.9, 125.26, 127, 54, 132.85, 136.4 м.д., двух метильных групп в триптантриновом ядре при 19.85 и 20.28, трех метильных групп в $N(CH_3)_3$ фрагменте при 54.09 м.д. Со-

единение **3**, выход 50%, т. пл. $248\text{--}249^\circ C$ (из этанола) было получено при кипячении спиртового раствора эквимольных количеств изатина и реактива Жирара Т в присутствии ТФУ в течение 3 ч. В его ИК спектре (KBr) имелись полосы поглощения при 1690 см^{-1} (лактамы и амидные карбонилы), 1620 см^{-1} (C=N), 3426 см^{-1} (NH), а полоса, характерная для карбонила в пятичленном цикле исходного изатина (1740 см^{-1}), отсутствовала. (+)ЭРИ МС высокого разрешения (Agilent 1200, колонка Eclipse, система AcCN: H_2O :ТФУ, 4:1: O.1%, ВУ 9.2 мин) показал катион: 261.1357 (M–Cl $^-$) $^+$, вычислено для $C_{13}H_{17}N_4O_2$ 261.1346. В DEPT спектре **2b** имелись сигналы 4 CH групп в изатиновом ядре при 112.31, 121.82, 123.33, 133.45, а также $N(CH_3)_3$ и CH_2 групп в боковой цепи при 54.40 и 62.2 м.д.

Изучение антипролиферативной активности полученных веществ и веществ сравнения (**1a**, **2a**) было выполнено на опухолевых клетках человека различного гистогенеза с использованием МТТ-теста [7, 10]. Скрининговая панель включала следующие линии опухолевых клеток человека: карциномы молочной железы MCF-7, карциномы легкого A-549, миелоидного лимфолейкоза K-562 и его сублинии K-562/4 (с множественной лекарственной устойчивостью, вызванной экспрессией гликопротеина P), аденокарциномы толстой кишки HCT-116 и ее резистентного штамма HCT116p53ko (с делецией гена опухолевого супрессора p53–/–), а также линию неопухолевых, клеток фибробластов человека (ПФЧ) для сравнения жизнеспособности нормальных и опухолевых клеток в стандартных условиях тестирования исследуемых соединений. Все линии клеток дикого типа были приобретены в American Type Culture Collection (ATCC, США). Линии клеток ПФЧ, HCT116p53ko и K-562/4 – любезно предо-

Таблица 1. Антипролиферативная активность производных триптантрина и мостотрина

Соединения	ИК ₅₀ *, мкМ						
	MCF-7	A-549	K-562	K-562/4	HCT-116	HCT-116 p53ko	ПФЧ
Триптантрин (1a)	>50.0	нт**	0.21 ± 0.02	6.0 ± 0.8	>50.0	>50.0	0.30 ± 0.04
8-Фтортриптантрин (1б)	3.5 ± 0.4	6.8 ± 0.4	2.5 ± 0.3	2.2 ± 0.3	2.9 ± 0.3	2.3 ± 0.4	5.1 ± 0.6
2,8-Диметилтриптантрин (1в)	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0
Мостотрин (2a)	11.1 ± 2.1	нт**	1.0 ± 0.10	нт**	5.0 ± 0.7	нт**	нт**
8-Фтормостотрин (2б)	10.8 ± 1.3	16.3 ± 1.9	7.1 ± 0.8	6.8 ± 0.4	6.7 ± 0.2	8.0 ± 1.2	9.0 ± 1.0
2,8-Диметилмостотрин (2в)	15.4 ± 2.1	21.3 ± 2.7	18.5 ± 2.0	> 50.0	25.5 ± 3.3	25.2 ± 2.5	41.2 ± 5.6
Производное 3	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0
Доксорубицин	0.41 ± 0.03	0.52 ± 0.06	0.33 ± 0.03	6.1 ± 0.5	0.40 ± 0.06	1.1 ± 0.1	0.28 ± 0.04

* ИК₅₀, мкМ — концентрация исследуемого вещества, ингибирующая рост клеток на 50%. Результаты представлены как среднее трех независимых экспериментов ± стандартное отклонение ($p < 0.05$).

** нт — соединение не тестировалось.

Таблица 2. Сравнительная противомикробная активность аналогов мостотрина и триптантрина

Соединения	Штаммы микроорганизмов, МПК, мкг/мл				
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. cereus</i> ATCC 10702	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
Триптантрин (1a)	32	8	8	>32	—
8-Фтортриптантрин (1б)	>32	>32	>32	>32	>32
2,8-Диметилтриптантрин (1в)	>32	>32	>32	>32	>32
Мостотрин (2a)	64	128	8	>32	—
8-Фтормостотрин (2б)	16	>32	16	>32	32
2,8-Диметилмостотрин (2в)	8	>32	4	>32	>32
Производное 3	>32	>32	>32	>32	>32

ставлены проф. Штилем А.А. (ФГБУ “НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина”, Москва). В качестве положительного контроля использован противоопухолевый антибиотик доксорубицин (Sigma, USA). Полученные данные представлены в табл. 1.

В проведенных экспериментах наиболее активным по сравнению с триптантрином (**1a**) на всех линиях опухолевых клеток, кроме линии K-562, оказался 8-фтортриптантрин (**1б**). При этом он продемонстрировал на порядок меньшую токсичность для клеток неопухолевой линии ПФЧ. Для мостотрина (**2a**) и 8-фтормостотрина (**2б**) значения ИК₅₀ для большей части использованных в эксперименте линий клеток практически совпадали, однако в отношении клеток линии K-562 мостотрин оказался более активным.

Неактивными для всех линий клеток, на которых проводился эксперимент, оказались диметилированное производное триптантрина (**1в**) и изатинное производное (**3**) (табл. 1). В то же время у диметилированного производного мостотрина (**2в**), аналогичного **1в**, наблюдалось неболь-

шое увеличение антипролиферативной активности практически в отношении всех линий клеток.

Хотя полученные нами соединения (**1б** и **2б**) оказались менее цитотоксичными по сравнению с известным противоопухолевым препаратом доксорубицином для всех протестированных нами опухолевых линий клеток, в то же время для линии незлокачественных фибробластов (ПЧФ) их токсичность оказалась намного ниже.

Противомикробную активность соединений оценивали стандартным методом серийных разведений в 96 луночных планшетах по минимальной подавляющей концентрации (МПК). В работе использовали штаммы микроорганизмов из коллекции ФГБНУ Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 10702, *Candida albicans* ATCC 10231. Бактериальные культуры анализировали в бульоне Mueller-Hinton Broth (“Beckton, Dickinson”, Франция), *Candida albicans* в среде RPMI (SIGMA Lot SLBZ6264, USA). Чув-

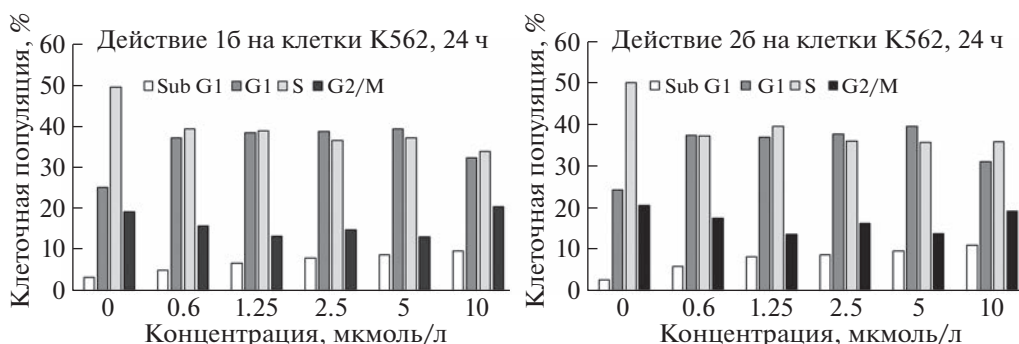


Рис. 1. Действие **16** и **26** на клеточный цикл опухолевых клеток К-562.

ствительность тест-микроорганизмов к аналогам, триптантрину и мостотрину изучали в диапазоне концентраций от 1 до 32 мкг/мл. Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) оценивали по наименьшей концентрации для каждого соединения, подавляющей видимый рост микроорганизмов после инкубации при $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч [10–12].

Результаты тестирования, представленные в табл. 2, указывают на то, что производные триптантрина обладают меньшей противомикробной активностью, чем сам триптантрин (**1a**). В то же время аналоги мостотрина (**2a**) обладают более высокой активностью по сравнению с мостотрином: (соединение **2б**) в отношении *S. aureus* ATCC 29213, а (соединение **2в**) как в отношении *S. aureus* ATCC 29213, так и *B. cereus* ATCC 10702.

Таким образом, наиболее перспективными являются 8-фтортриптантрин (**16**) и 8-формостотрин (**26**), обладающие высокой антипролиферативной активностью в отношении различных линий опухолевых клеток, а также 2,8-диметилмостотрин (**2в**), оказывающий высокое антибактериальное действие в отношении *S. aureus* ATCC 29213. Полученные данные позволили выбрать соединения (**16**, **26** и **2в**) для дальнейших *in vivo* экспериментов на лабораторных животных.

Ранее было показано, что мостотрин (**2a**) может взаимодействовать с бороздками ДНК [7], а триптантрин (**1a**) ингибировать ферменты, связанные с воспалением [13, 14]. Однако особенности молекулярных механизмов действия других синтезированных нами соединений пока не были изучены.

Учитывая этот факт, мы исследовали характер действия различных концентраций 8-фтортриптантрина (**16**) и 8-формостотрина (**26**) на клеточный цикл опухолевых клеток К-562, используя метод проточной цитометрии [15] (рис. 1).

Результаты показали, что соединения **16** и **26** ингибируют переход опухолевых клеток с фазы G1 в фазу S клеточного цикла, где происходит ре-

пликация ДНК. Блокирование клеточного цикла опухолевых клеток часто приводит к их гибели по механизмам апоптоза, что, очевидно, лежит в основе одного из возможных механизмов антипролиферативного действия этих веществ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jahng Y. Progress in the studies on tryptanthrin, an alkaloid of history // Arch. Pharm. Res. 2013. V. 36. № 5. P. 517–535.
2. Kaur R., Manjal S.K., Raval R.K., et al. Recent synthetic and medicinal perspectives of tryptanthrin // Bioorg. Med. Chem. 2017. V. 25. № 17. P. 4533–4552.
3. Moskovkina T.V., Denisenko M.V., Kalinovskiy A.I., et al. Oxidation of isatin and its 5-substituted analogs with potassium permanganate // Russ. J. Org. Chem. 2013. V. 49. P. 1740–1743.
4. Mani J.S., Johnson J.B., Steel J.C., Broszczak D.A., et al. Natural product-derived phytochemicals as potential agents against coronaviruses: a review // Virus Res. 2020. V. 284. P. 197989.
5. Chan H.-L., Yip H.Y., Mak N.-K., et al. Modulatory effects and action mechanism of tryptanthrin on murine leukemia cells // Cell Mol. Immunol. 2009. V. 6. № 5. P. 335–342.
6. Cheng H.M., Wu Y.C., Wang Q., et al. Clinical efficacy and IL-17 targeting mechanism of Indigo naturalis in moderate psoriasis // BCM Complement Altern. Med. 2017. V. 17. № 1. P. 439.
7. Popov A., Klimovich A., Styshova O., et al. Design, synthesis and biomedical evaluation of mostotrin, a new water soluble tryptanthrin derivative // Int. J. Molecular Med. 2020. V. 46. № 4. P. 1335–1346.
8. Lutnaes B.F., Luthe G., Brinkman UAT, et al. Characterization of monofluorinated polycyclic aromatic compounds by ^1H , ^{13}C and ^{19}F NMR spectroscopy // Magn. Reson. Chem. 2005. V. 43. № 7. P. 588–594.
9. Zheng X., Hou B., Wang R., et al. Synthesis of substituted tryptanthrin via aryl halides and amines as antitumor and anti-MRSA agents // Tetrahedron. 2019. V. 75. № 29. P. 130351.
10. Tikhomirov A.S., Tsvetkov V.B., Kaluzhny D.N., et al. Tri-armed ligands of G-quadruplex on heteroarene-fused anthraquinone scaffolds: Design, synthesis and

- pre-screening of biological properties. *Eur. J. Med. Chem.* 2018. V. 159. № 5. P. 59–73.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2015 (M07-A10). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests For bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard, 10th ed.; CLSI: Wayne, PA, USA, 2015.
12. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing for Yeasts. 4th ed. CLSI standard M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
13. *Ishihara T., Ishihara T., Kohno K., Ushio S., et al.* Tryptanthrin inhibits nitric oxide and prostaglandin E(2) synthesis by murine macrophages // *Eur. J. Pharmacol.* 2000. V. 407. № 1–2. P. 197–204.
14. *Pergola C., Jazzar B., Rossi A., et al.* On the inhibition of 5-lipoxygenase product formation by tryptanthrin: mechanistic studies and efficacy in vivo // *Brit. J. Pharm.* 2012. V. 165. № 3. P. 765–776.
15. *Krishan A.J.* Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining // *Cell Biol.* 1975. V. 66. № 1. P. 188.

BIOLOGICAL ACTIVITY AND PROBABLE MECHANISMS OF ACTION OF DERIVATIVES OF TRYPTANTHRIN AND MOSTOTRIN ALKALOIDS

A. M. Popov^{a, #}, L. G. Degenkova^b, T. V. Moskovkina^c, N. E. Grammatikova^b, A. S. Kuzmich^a, O. V. Chernikov^a, A. E. Schekotichin^b, and Academician of the RAS V. A. Stonik^a

^a*G.B. Elyakov Pacific Institute Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Science, Vladivostok, Russian Federation*

^b*Gauze Research Institute for The Search for New Antibiotics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^c*Institute of High Technologies and Advanced Materials, Far East Federal University, Vladivostok, Russian Island, Ayaks Bay, 10, Russian Federation*

[#]*e-mail: popovam@piboc.dvo.ru*

The alkaloid tryptanthrin and its water-soluble derivative mostotrin exhibit high antimicrobial and antitumor activity. To develop more active and less toxic preparations, syntheses and testing of the biological activities of a number of new and/or little-studied analogs were performed. Some of them have been shown to have higher cytotoxicity against tumor and antimicrobial cells than tryptanthrin and mostotrin. Thus, 8-fluorotryptanthrin effectively inhibits the proliferation of various tumor cell lines, namely: K-562/4, HCT-116 and HCT-116p53ko at lower concentrations than tryptanthrin, and 2,8-difluorostotrin exhibits a stronger antimicrobial effect against pathogenic bacteria *S. aureus* ATCC 29213 than mostotrin. It has been established that the antiproliferative properties of 8-fluorotryptanthrin and 8-fluormostotrin are associated with their ability in nanomolar concentrations to inhibit the cell cycle of tumor cells at the stage of transition from the G1 phase to the S phase. The data obtained indicate the prospects for further in-depth studies of their antitumor properties.

Keywords: quinazoline alkaloids derivatives, tumor cells, antimicrobial activity, cell cycle blocking

УДК 569.323:551.793(597)

ПЕРВАЯ НАХОДКА *EOTHENOMYS* (ARVICOLINAE, CRICETIDAE, RODENTIA) В ПЛЕЙСТОЦЕНЕ ВЬЕТНАМА

© 2023 г. Академик РАН А. В. Лопатин^{1,*}

Поступило 27.09.2022 г.

После доработки 10.10.2022 г.

Принято к публикации 10.10.2022 г.

Из среднеплейстоценового пещерного местонахождения Там-Хай в северном Вьетнаме (провинция Лангшон) по изолированным зубам определена южноазиатская полевка *Eothenomys eleusis* (Thomas, 1911). Эта первая находка Arvicolinae в плейстоцене Вьетнама и первая ископаемая находка представителей рода *Eothenomys* за пределами Китая.

Ключевые слова: *Eothenomys*, южноазиатские полевки, Arvicolinae, Cricetidae, средний плейстоцен, Вьетнам, Лангшон

DOI: 10.31857/S2686738922600704, **EDN:** MPLHYT

Единственный представитель подсемейства Arvicolinae во Вьетнаме — южноазиатская полевка, обитающая на самом севере страны, в горных лесах провинции Лаокай западнее Красной реки (Хонгха). Эта изолированная популяция *Eothenomys* обычно относится [1, 2] к подвиду *E. melanogaster confinii* Hinton, 1923 (= *E. miletus confinii* [3, 4]). Также вьетнамские полевки рассматривались в составе вида *E. mucronatus* (Allen, 1912) [4], который синонимизируется с *E. melanogaster* (Milne-Edwards, 1871) [5] или *E. miletus* (Thomas, 1914) [6]. В настоящее время по морфологическим и молекулярно-генетическим данным типичная форма *E. miletus confinii* считается [5, 7] идентичной качинской полевке *E. cachinus* (Thomas, 1921) (= *E. eleusis cachinus* [8]), тогда как вьетнамская популяция *Eothenomys* рассматривается в составе *E. melanogaster* [5], *E. miletus* [6] или *E. eleusis* (Thomas, 1911) [8]. Для вьетнамской популяции характерны сравнительно крупные размеры черепа и стабильное наличие четырех лингвальных выходящих углов (lingual salient angles) на последнем верхнем коренном зубе М³ [5]; при этом для *E. melanogaster* типично наличие трех лингвальных выходящих углов, а для *E. eleusis* (включая *E. eleusis miletus*) — четырех [5, 8–10].

Ископаемые находки *Eothenomys melanogaster* sensu lato известны в Китае с нижнего плейстоцена [11–13]. В настоящей статье описаны первые ископаемые находки Arvicolinae во Вьетнаме —

изолированные зубы *E. eleusis* из среднего плейстоцена пещеры Там-Хай, расположенной в уезде Биньзя провинции Лангшон. Они собраны экспедиционным отрядом Палеонтологического института им. А.А. Борисяка РАН (ПИН) в марте 2021 г. в ходе работ Совместного Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра (Тропический центр, Ханой). Пещера Там-Хай (Thâm Hai) входит в пещерный комплекс Там-Кхюиен (Thâm Khuỷen), известный совместными находками ранних людей и гигантопитеков и датированный средним плейстоценом (Там-Хай: 300–200 тыс. лет, 250 тыс. лет; Там-Кхюиен: 475 ± 125 тыс. лет) [14, 15]. Материал происходит из обособленной северной галереи пещеры (21°55'52.5" с.ш., 106°25'4" в.д.) [см. 16].

Описанный материал хранится в коллекции ПИН, Москва. Терминология строения зубов по [17], систематика Arvicolinae — по [8]. Изображения получены с помощью сканирующего электронного микроскопа Tescan Vega 3 ХМУ в ПИН.

Отряд Rodentia Bowdich, 1821

Семейство Cricetidae Fischer, 1817

Подсемейство Arvicolinae Gray, 1821

Триба Clethrionomyini Hooper et Hart, 1962

Подтриба Eothenomyina Kryštufek et Shenbrot, 2022

Род *Eothenomys* Miller, 1896

Eothenomys eleusis (Thomas, 1911)

Microtus (Eothenomys) melanogaster eleusis: [18, с. 50].

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

*e-mail: alop@paleo.ru

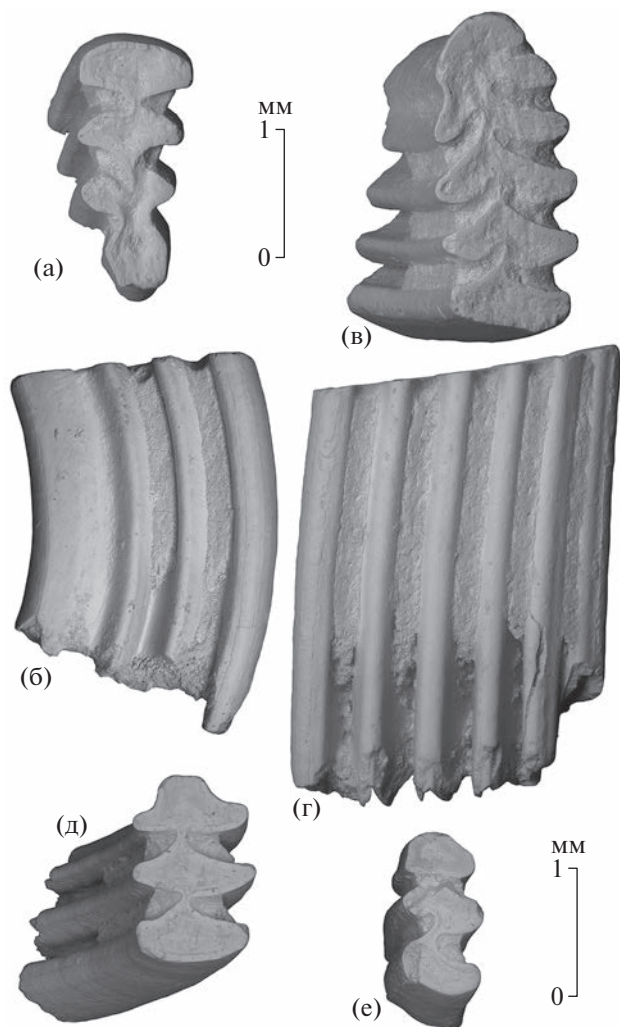


Рис. 1. *Eothenomys eleusis* (Thomas, 1911): а, б — экз. ПИН, № 5826/556, левый M^3 : а — с окклюзиальной стороны, б — с буккальной стороны; в, г — экз. ПИН, № 5826/555, левый M_1 : в — с окклюзиальной стороны, г — с лингвальной стороны; д — экз. ПИН, № 5826/557, левый M_2 с окклюзиальной стороны; е — экз. ПИН, № 5826/558, левый M_3 с окклюзиальной стороны; Вьетнам, провинция Лангшон, пещера Там-Хай; средний плейстоцен.

Голотип — Британский музей, Лондон, ВМ № 11.9.8.111, взрослый самец; Китай, Северная Юньнань; современный.

Описание (рис. 1, 2). Зубы бескорневые, с обильным цементом во входящих углах. Эмаль толстая, равномерной толщины на передних и задних сторонах треугольных призм, несколько тоньше в глубине входящих углов.

Последний верхний моляр M^3 с широкой симметричной передней петлей (AL), четырьмя лингвальными и тремя буккальными выходами углами и сильно удлиненной задней непарной петлей (пяткой), составляющей более 30% от об-

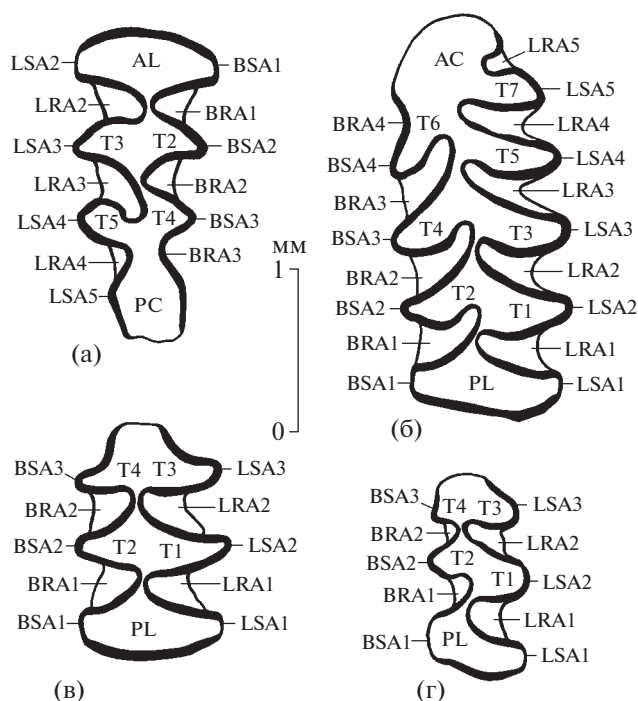


Рис. 2. *Eothenomys eleusis* (Thomas, 1911), строение жевательной поверхности коренных зубов: а — экз. ПИН, № 5826/556, левый M^3 ; б — экз. ПИН, № 5826/555, левый M_1 ; в — экз. ПИН, № 5826/557, левый M_2 ; г — экз. ПИН, № 5826/558, левый M_3 ; Вьетнам, провинция Лангшон, пещера Там-Хай; средний плейстоцен. Обозначения: AC — передняя непарная петля, AL — передняя петля, BRA1–BRA4 — буккальные входящие углы, BSA1–BSA4 — буккальные исходящие углы, LRA1–LRA5 — лингвальные входящие углы, LSA1–LSA5 — лингвальные исходящие углы, PC — задняя непарная петля (пятка), PL — задняя петля, T1–T7 — треугольные петли.

щей длины зуба по жевательной поверхности. Треугольные петли попарно слиты (T2–T3, T4–T5), соответствующие входящие углы (BRA1–LRA2, BRA2–LRA3) противопоставлены. LRA3 намного глубже BRA2 и сильнее протягивается дистально. Наиболее дистальный лингвальный исходящий угол LSA5 едва выражен, но обособляющий его неглубокий лингвальный входящий угол LRA4 заполнен цементом, в отличие от противоположающей бесцементной буккальной складки, представляющей собой зачаточный буккальный входящий угол BRA3 (рис. 1а, 1б, 2а).

Передний нижний моляр M_1 удлиненный (рис. 1в, 1г, 2б), с крупной передней непарной петлей (AC), тремя буккальными (BRA3, BRA2, BRA1) и пятью лингвальными (LRA5, LRA4, LRA3, LRA2, LRA1) входящими углами, заполненными цементом, и умеренно широкой задней петлей (PL) с противоположащими исходящими углами (BSA1–LSA1). Наиболее передний лингвальный входящий угол LRA5 сравнительно не-

глубоко вдаётся в переднюю непарную петлю (по глубине составляет приблизительно треть других входящих углов), обособляя переднюю из лингвальных треугольных петель — T7. Лингвальному входящему углу LRA4 противолежит неглубокая бесцементная борозда (зачаточный буккальный входящий угол BRA4), обозначающая обособление передней буккальной треугольной петли T6, противолежащей лингвальной треугольной петле T5. Более дистальные входящие углы чередуются (BRA3/LRA3, BRA2/LRA2, BRA1/LRA1), а треугольные петли попарно слитые (T4—T3, T2—T1), с противопоставленными выходящими углами (BSA3—LSA3, BSA2—LSA2).

M₂ сравнительно короткий, с тремя одинаково широкими петлями (рис. 1д, 2в). Петли поперечно вытянутые, T4—T3 и T2—T1 попарно слитые, входящие и выходящие углы противопоставленные (BRA2—LRA2, BRA1—LRA1; BSA3—LSA3, BSA2—LSA2, BSA1—LSA1).

M₃ мелкий, узкий, задняя петля сравнительно широкая (рис. 1е, 2г). Петли слабо расширены поперечно, передние входящие и все выходящие углы противопоставлены (BRA2—LRA2; BSA3—LSA3, BSA2—LSA2, BSA1—LSA1), тогда как BRA1 располагается заметно мезиальнее, чем LRA1, и направлен антеролингвально, а не поперечно, обозначая чередование T2 и T1.

Размеры (L — наибольшая длина, W — наибольшая ширина, в мм): M³ (экз. ПИН, № 5826/556): L — 2.05, W — 0.95, длина задней непарной петли — 0.65; M₁ (экз. ПИН, № 5826/555): L — 2.65, W — 1.2; M₂ (экз. ПИН, № 5826/557): L — 1.5, W — 1.0; M₃ (экз. ПИН, № 5826/558): L — 1.3, W — 0.65.

Сравнение и замечания. Согласно современным данным [8], род *Eothenomys* включает три рецентных вида: *E. melanogaster* (Milne-Edwards, 1871) в южном Китае севернее р. Янцзы, *E. colurnus* (Thomas, 1911) в юго-восточном Китае южнее р. Янцзы и на о. Тайвань и *E. eleusis* (Thomas, 1911) в юго-западной части Китая и соседних областях Индии, Мьянмы, Вьетнама и Таиланда. *E. eleusis* рассматривается как политипический вид с пятью отчетливыми подвидами, помещенными в три подвиговые группы. Подвиговая группа *eleusis* включает *E. eleusis eleusis* (восточная часть видового ареала к югу от р. Янцзы в Китае, а также северный Вьетнам и северный Таиланд), *E. eleusis miletus* (Сычуань и Юньнань между р. Меконг и Красной рекой) и *E. eleusis fidelis* Hinton, 1923 (южная Сычуань между р. Ялунцзян и Красной рекой и соседние области Юньнани). Еще два подвида — *E. eleusis cachinus* (Thomas, 1921), обитающий на северо-западе Юньнани, севере Мьянмы и северо-востоке Индии, и *E. eleusis shimianensis* Liu in Liu et al., 2019, известный только из уезда Шимьянь китайской провинции Сычуань, по отдельности образуют собственные под-

видовые группы — *cachinus* и *shimianensis* соответственно [8].

Морфотип M³ с четырьмя лингвальными и тремя буккальными выходящими углами свойственен *E. eleusis shimianensis* (100%), *E. eleusis eleusis* (90%), *E. eleusis miletus* (90%), *E. eleusis fidelis* (90%), встречается у *E. eleusis cachinus* (35%) и крайне редок у *E. melanogaster* (2%) [7]. Морфотип M³ с четырьмя выходящими углами с буккальной и лингвальной сторон представлен у *E. eleusis cachinus* (50%), *E. eleusis eleusis* (10%) и *E. eleusis fidelis* (10%), но отсутствует у *E. eleusis miletus*, *E. eleusis shimianensis*, *E. colurnus* и подавляющего большинства (99%) экземпляров *E. melanogaster* [7].

Размеры, морфотип M³ с четырьмя лингвальными и тремя буккальными выходящими углами и строение других зубов позволяют относить полевку из среднего плейстоцена пещеры Там-Хай к *E. eleusis*.

Новые данные о современном таксономическом разнообразии *Eothenomys* [7, 8, 19] предполагают необходимость ревизии видовой идентификации ископаемых находок, отнесенных ранее к *E. melanogaster* (например, [11]).

Материал. Из местонахождения Там-Хай четыре изолированных зуба: M³ (экз. ПИН, № 5826/556), M₁ (экз. ПИН, № 5826/555), M₂ (экз. ПИН, № 5826/557) и M₃ (экз. ПИН, № 5826/558).

Результаты филогеографического анализа [20] демонстрируют, что ареал *Eothenomys melanogaster sensu lato* (примерно соответствует объему подрода *Eothenomys* в понимании [7] и объему рода *Eothenomys* в понимании [8]) достиг современных пределов около 488 тыс. л.н. Дальнейшее развитие горного рельефа привело к возникновению адаптаций к средне- и высокогорным ландшафтам и холодному климату, последующей изоляции и генетической дифференциации отдельных высокогорных популяций во время потеплений (концепция “небесных островов”), что стало причиной формирования ряда таксонов видового и подвидового ранга [7, 20]. Современный дизъюнктивный ареал и таксономическое разнообразие *Eothenomys* сформировались под влиянием чередования теплых и холодных фаз плейстоцена. Предполагается быстрое обособление трех клад, представители которых обитают ныне в разных регионах Китая: юго-восточной клады (юго-восточное побережье Китая и о. Тайвань), центральной (горное обрамление Сычуаньской впадины и юго-восточный край Тибетского нагорья) и юго-западной (Юньнань-Гуйчжоуское нагорье и южная часть Сино-Тибетских гор) [20].

По современным представлениям [8], юго-восточная клада соответствует виду *E. colurnus*, центральная — *E. melanogaster*, а юго-западная —

E. eleusis. Предполагаемый порядок ветвления клад в эволюционном сценарии [7]: *E. colurnus* (*E. melanogaster* (*E. cachinus* + *E. shimianensis*) (*E. miletus* (*E. eleusis* + *E. fidelis*))).

Описанные остатки представляет собой первую ископаемую находку *Eothenomys* за пределами Китая. Среднеплейстоценовая форма из Вьетнама имеет выраженные примитивные признаки коренных зубов (простое строение М³, чередующиеся Т5/Т6 на М₁ и Т1/Т2 на М₃), в целом соответствующие наименее продвинутым морфотипам *E. eleusis*.

Присутствие *E. eleusis* в среднеплейстоценовом местонахождении Там-Хай предполагает возможность очень давнего обособления рецессивной вьетнамской популяции *Eothenomys*, что позволяет ставить вопрос о ее подвидовой самостоятельности. Кроме того, локализация плейстоценовых находок в провинции Лангшон, северо-восточнее Красной реки, на значительном удалении от области обитания современной вьетнамской популяции в провинции Лаокай, свидетельствует о длительной и сложной истории *E. eleusis* в данном регионе.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарен А.С. Тесакову (Геологический институт РАН, Москва) за полезное обсуждение морфологии и систематики *Eothenomys*, Е.Н. Машенко, Н.В. Волковой, А.В. Подлеснову, Б.И. Морковину (ПИН) и Ле Суан Даку (Институт тропической экологии Совместного Российско-Вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра, Ханой) — за участие в сборах материалов в 2021 г., А.Н. Кузнецову и С.П. Кузнецовой (Тропический центр) — за помощь в организации экспедиции, Р.А. Ракитову (ПИН) — за помощь в подготовке иллюстраций на СЭМ, А.О. Аверьянову (Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург) — за предоставленные для сравнительного изучения материалы по современным полевкам Вьетнама.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках программы работ Совместного Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра (проект “Состав фауны приматов (Cercopithecidae, Pongidae) и грызунов (Rodentia) плейстоцена и голоцена Вьетнама как индикатор изменения экологических условий”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Osgood W.H. Mammals of the Kelley-Roosevelts and Delacour Asiatic expeditions // Field Museum of Natural History. Zoological Series. 1932. V. 18. № 10. P. 193–339.

2. Кузнецов Г.В. Млекопитающие Вьетнама. М.: Т-во научных изданий КМК, 2006.
3. Wang Y.-X., Li C.-Y. Genus *Eothenomys* Miller, 1896. In: Luo Z.-X., Chen W., Gao W., eds. Fauna Sinica. Mammalia. V. 6. Rodentia. Part III: Cricetidae. Beijing: Science Press, 2000. P. 388–462.
4. Kaneko Y. Morphological variation and geographical and altitudinal distribution in *Eothenomys melanogaster* and *E. mucronatus* (Rodentia, Arvicolinae) in China, Taiwan, Burma, India, Thailand, and Vietnam // Mammal Study. 2002. V. 27. P. 31–63.
5. Wilson D.E., Reeder D.M., eds. Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference. 3 ed. Baltimore, Maryland: The Johns Hopkins University Press, 2005.
6. Pardiñas U.F.J., Myers P., León-Paniagua L. et al. Cricetidae (true hamsters, voles, lemmings and New World rats and mice). In: Wilson D.E., Lacher T.E., Mittermeier R.A., eds. Handbook of the mammals of the World. V. 7. Rodents II. Barcelona: Lynx Ed., 2017. P. 204–535.
7. Liu S.-Y., Chen S.-D., He K. et al. Molecular phylogeny and taxonomy of subgenus *Eothenomys* (Cricetidae: Arvicolinae: *Eothenomys*) with the description of four new species from Sichuan, China // Zoological Journal of the Linnean Society. 2019. V. 186. P. 569–598.
8. Kryštufek B., Shenbrot G.I. Voles and lemmings (Arvicolinae) of the Palaearctic Region. Maribor: University of Maribor Press, 2022.
9. Allen G.M. Mammals of China and Mongolia // The natural history of Central Asia. V. 11. Part 2. New York: American Museum of Natural History, 1940. P. 621–1350.
10. Corbet G.B., Hill J.E. Mammals of the Indomalayan Region: systematic review. Oxford: Oxford University Press, 1992.
11. Zheng S. Quaternary rodents of Sichuan-Guizhou Area, China. Beijing: Science Press, 1993.
12. Zheng S. Rodentia. In: Zheng S., ed. Jianshi hominid site. Beijing: Science Press, 2004. P. 121–181, 387–394.
13. Jin C.Z., Zhang Y.Q., Wei G.B. et al. Rodentia Bowdich, 1821. In: Jin C., Liu J., eds. Paleolithic site — the Renzidong Cave, Fanchang, Anhui Province. Beijing: Science Press, 2009. P. 166–220, 401–412.
14. Olsen J.W., Ciochon R.L. A review of evidence for postulated Middle Pleistocene occupations in Viet Nam // Journal of Human Evolution. 1990. V. 19. P. 761–788.
15. Ciochon R., Vu The Long, Larick R. et al. Dated co-occurrence of *Homo erectus* and *Gigantopithecus* from Tham Khuyen Cave, Vietnam // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1996. V. 93. № 7. P. 3016–3020.
16. Лонгун А.В. Новый вид *Typhlomys* (Platacanthomyidae, Rodentia) из среднего плейстоцена северного Вьетнама // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2021. Т. 501. № 1. С. 505–510.
17. Тесаков А.С. Биостратиграфия среднего плиоцена — эоплейстоцена Восточной Европы (по мелким млекопитающим). Москва: Наука, 2004.

18. *Thomas O.* On mammals collected in the provinces of Sze-chuan and Yunnan, western China, by Mr. Malcolm Anderson, for the Duke of Bedford's Exploration // Abstracts of the Proceedings of the Zoological Society of London. 1911. № 100. P. 48–50.
19. *Tang M., Chen Z., Wang X. et al.* A summary of phylogenetic systematics studies of Myodini in China (Rodentia: Cricetidae: Arvicolinae) // Acta Theriologica Sinica. 2021. V. 41. № 1. P. 71–81.
20. *Lu X., Cheng J., Meng Y. et al.* Disjunct distribution and distinct intraspecific diversification of *Eothenomys melanogaster* in South China // BMC Evolutionary Biology. 2018. V. 18. Art. 50. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1168-3>

THE FIRST RECORD OF *EOTHENOMYS* (ARVICOLINAE, CRICETIDAE, RODENTIA) FROM THE PLEISTOCENE OF VIETNAM

Academician of the RAS **A. V. Lopatin**^{a,#}

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

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

The Oriental vole *Eothenomys eleusis* (Thomas, 1911) is identified from the Middle Pleistocene Tham Hai cave locality in northern Vietnam (Lang Son Province) based on isolated teeth. This is the first record of the Pleistocene Arvicolinae in Vietnam and the first fossil find of *Eothenomys* outside of China.

Keywords: *Eothenomys*, Oriental voles, Arvicolinae, Cricetidae, Middle Pleistocene, Vietnam, Lang Son

УДК 599.723(571.54/.55)

НОВЫЕ ДАННЫЕ О МОРФОЛОГИИ ЗУБОВ *HIPPARION TCHICOICUM* IVANJEV, 1966 ИЗ ЗАПАДНОГО ЗАБАЙКАЛЬЯ (РОССИЯ)

© 2023 г. Н. П. Калмыков^{1,*}

Представлено академиком РАН Г.Г. Матишовым

Поступило 04.07.2022 г.

После доработки 01.08.2022 г.

Принято к публикации 03.08.2022 г.

Сообщение посвящено морфологическим особенностям зубов трехпалой лошади (*Hipparion tchicoicum*) из плиоцена Западного Забайкалья (Россия). В нем впервые приведен ряд диагностических признаков чикойского гиппариона, которые являются критериями для определения этого таксона среди других окаменелостей трехпалых лошадей и реального разнообразия на заключительном этапе их распространения во Внутренней Азии.

Ключевые слова: плиоцен, млекопитающие, *Hipparion tchicoicum*, Удунга, Западное Забайкалье

DOI: 10.31857/S2686738922600492, **EDN:** MKCDJQ

Систематизации трехпалых лошадей рода *Hipparion* придается большой смысл в связи с их непреходящим значением не только для стратиграфии и палеонтологического обоснования геологического возраста отложений, включающие их окаменелости, но и выявления их реального разнообразия. В настоящее время в силу широкой географической и индивидуальной изменчивости только в Евразии описано более полусотни таксонов различного ранга (подвидов, видов, родов), что создает определенные проблемы в их чрезвычайно запутанной классификации [1]. Новые данные из Западного Забайкалья (Россия), где в последнее время были найдены остатки гиппарионов, представляют существенный вклад в распознавание их видовой принадлежности, в частности, чикойского гиппариона — *Hipparion tchicoicum* Ivanjev, 1966.

В Селенгинском среднегорье остатки этой трехпалой лошади впервые были найдены в красных пролювиально-эоловых супесях Чикойской впадины близ фермы Береговая (рис. 1), где они залежали *in situ* с окаменелостями других млекопитающих [2]. Из данного местонахождения к этому виду были отнесены фрагмент нижней челюсти с rd_{2-4} , почти не затронутые стиранием

M_{1-2} , а также P^3 или P^4 . Однако *Hipparion tchicoicum* sp. n., как новый вид, был выделен без указания голотипа. Он был крупным животным со средне складчатыми брахиодонтными зубами [3], верхние молочные зубы которого отличались длинной и широкой коронкой, коротким и узким протоконом, постоянные коренные — широким и коротким протоконом. Для нижних зубов, как молочных, так и постоянных, были характерны очень короткая задняя и более длинная передняя долька, средней величины энтоконид, гиппарионовая форма двойной петли, слабое проявление парастилида и гипостилида. Найденные зубы явно принадлежали не только разным особям, но и разным видам [3].

Помимо Чикойской впадины, остатки крупного гиппариона [4], по всей видимости, чикойского [3], были найдены в красных слюдистых супесях в г. Улан-Удэ и красно-бурой глине у подножия горы Тологой на левобережье р. Селенга, в 15 км выше по течению от города. В тологойском местонахождении остатки двух видов гиппарионов: *Hipparion tchicoicum* и *Hipparion longidonte* sp. n. [3] были приурочены к отложениям нижней толщи, *H. longidonte* впоследствии был признан недействительным и был сведен в синонимию *Hipparion houfenense* Teilhard de Chardin et Young, 1931 [1]. Накопление красноцветных глин третьей толщи предгорного шлейфа у горы Тологой, как и отложений близ фермы Береговая, происходило в конце среднего или начале позднего плиоцена [2].

¹ Федеральный исследовательский центр
Южный научный центр Российской академии наук,
Ростов-на-Дону, Россия

*e-mail: kalm@ssc-ras.ru

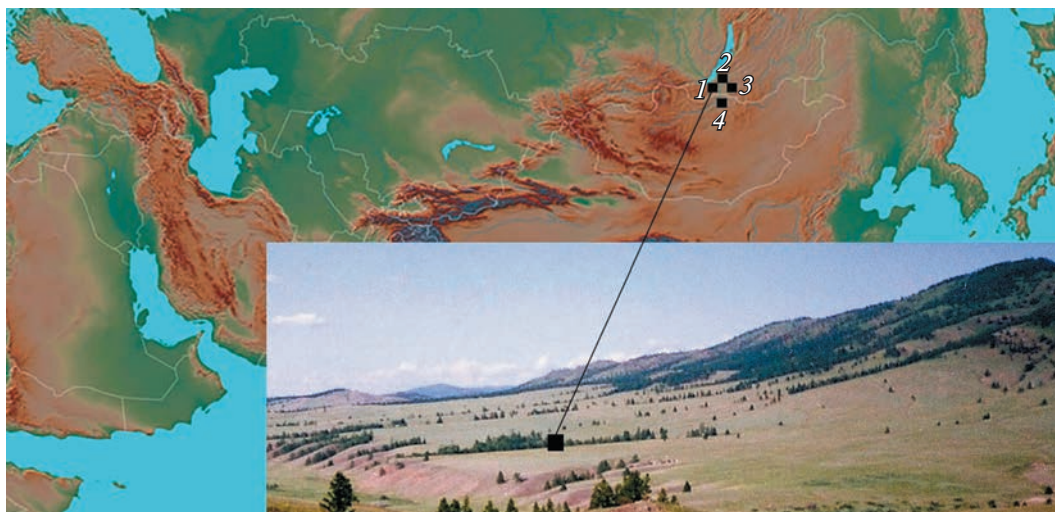


Рис. 1. Местонахождения остатков *Hipparion tchicoicum* в России (Западное Забайкалье) и Северной Монголии: 1 — Удунга (долина р. Темник), 2 — Улан-Удэ и Тологой (долина р. Селенга), 3 — Береговая (долина р. Чикой), 4 — местонахождение Шамар (долина р. Орхон)

Предпринятая в 70-х годах прошлого столетия ревизия всех видов центральноазиатских гиппарионов [1], в том числе забайкальских, дала возможность привести уточненные диагнозы для таксонов, которые были признаны валидными. В результате этого обследования к чикойскому гиппариону в Западном Забайкалье были отнесены остатки трехпалой лошади из местонахождения Береговая (*H. tchicoicum* [3, рис. 4; 5, 1] и *Hipparion* sp. [4, рис. 21, 3; 23, 3, 4]) и Шамар в Северной Монголии (*H. tchicoicum* [1, рис. 54; 55, А–Ж]). Отсутствие голотипа чикойского гиппариона побудило В.И. Жегалло [1] выбрать в качестве лектотипа нижнюю челюсть трехпалой лошади из местонахождения Шамар (№ 3381-53, колл. ПИН РАН, рис. 54, Б). Этот шаг позволил получить информацию, достаточную для того, чтобы обеспечить опознание обозначенного таксона. Небольшое расстояние между одновозрастными местонахождениями Шамар и Береговая, чуть более 100 км, и отсутствие непреодолимых естественных преград, в свою очередь, говорили о том, что в Орхон-Селенгинском и Селенгинском среднегорьях обитала многочисленная популяция очень крупного гиппариона. Верхние постоянные зубы шамарского гиппариона отличались гипсодонтичностью, слабой складчатостью эмали, коротким и широким протоконом. Нижние зубы были умеренно гипсодонтные, двойная петля была гиппарионового типа с признаками стеноновой. Эти признаки стали основой для формирования диагноза *H. tchicoicum* [1]. Помимо этих признаков, для премоляров чикойского гиппариона из Шамара была характерна наружная долька I типа (она не входит в шейку двойной петли), для моляров — II типа (она входит в шейку двойной петли).

Талонид на M_3 — простой, удлинённой формы. Эмаль, за исключением внутренних долинков, толстая. Лабиальная сторона зубов покрыта значительным слоем цемента. Отсутствие в Шамаре постоянных зубов верхней челюсти, а имеющиеся были представлены только pd^{2-4} , снизило ценность выделения лектотипа по одному ряду нижней челюсти, что впоследствии было восполнено исследованиями в Западном Забайкалье.

В ходе многолетних палеонтологических раскопок у подножия юго-западного склона Хамбинского хребта в Селенгинском среднегорье были найдены остатки разнообразных млекопитающих [5], в том числе и гиппарионов (*H. tchicoicum*, *H. houfenense* Teilhard de Chaardin et Young, 1931). Наряду с отдельными зубами и костями их посткраниального скелета из красноцветных отложений предгорного шлейфа были извлечены полные ряды зубов, как верхней (рис. 2), так и нижней челюсти (№ 987/307: 1–6, ЮНЦ РАН), принадлежавшие одной особи гиппариона (*H. tchicoicum*) [6]. Они залегали в анатомической последовательности несмотря на то, что облегачшее их костное вещество, как верхней, так и нижней челюсти, было растворено в отложениях с повышенной влажностью. Их окклюзионные поверхности были направлены против друг друга, что, несомненно, подтверждало их принадлежность к одному черепу трехпалой лошади.

В силу того, что чикойский гиппарион в Центральной Азии занимает довольно широкий временной интервал — от позднего миоцена до позднего плиоцена [6], название “*tchicoicum*” незаметно стало сборным для гиппарионов. Он нередко необоснованно указывается в составе гиппарионовых фаун России, Казахстана, Монголии и Се-



Рис. 2. Левые ряды зубов верхней и нижней челюсти *Hipparion tchicoicum* из Удунги (Западное Забайкалье, ранний плиоцен, № 987/307:1-6, ЮНЦ РАН): 1 – P^2-M^3 с окклюзионной стороны, 2 – то же самое с медиальной стороны, 3 – то же самое с латеральной стороны, 4 – P_2-M_3 с окклюзионной стороны, 5 – то же самое с латеральной стороны.

верного Китая, где его идентификация из-за степени сохранности, отсутствия явных диагностических признаков на найденном материале и неопределенности объема вида проводилась достаточно формально. Из местонахождения Шамар (Орхон-Селенгинское среднегорье) от *H. tchicoicum* были найдены левая ветвь нижней челюсти (№ 3381-53, колл. ПИН РАН), послужившая для выделения лектотипа [1], правая ветвь с сильно стертymi зубами (№ 970/947), фрагменты верхней челюсти с правыми и левыми pd^{2-4} (№ 3381-51) и нижней челюсти с правыми pd_{2-4} (№ 3381-54). В Удунге, как уже упоминалось, были обнаружены не только полные ряды постоян-

ных зубов верхней и нижней челюстей, но и P_2-M_1 (№ 987/50, ЮНЦ РАН), P_3 (№ 671), P_4 (№ 673) и pd_4 (№ 676, № 1269). Последние, как вариабельные и неспецифичные, остались за рамками данного исследования. Новый материал по *H. tchicoicum* из Селенгинского среднегорья (Удунга) дал возможность значительно расширить сведения о морфологических особенностях зубов чикойского гиппариона, полученные в результате предшествующих исследований [1–4].

Форма основных элементов рельефа окклюзионной поверхности, которым придается систематическое значение [1, 7, 8], на зубах гиппариона из Удунги достаточно разнообразна, однако ме-

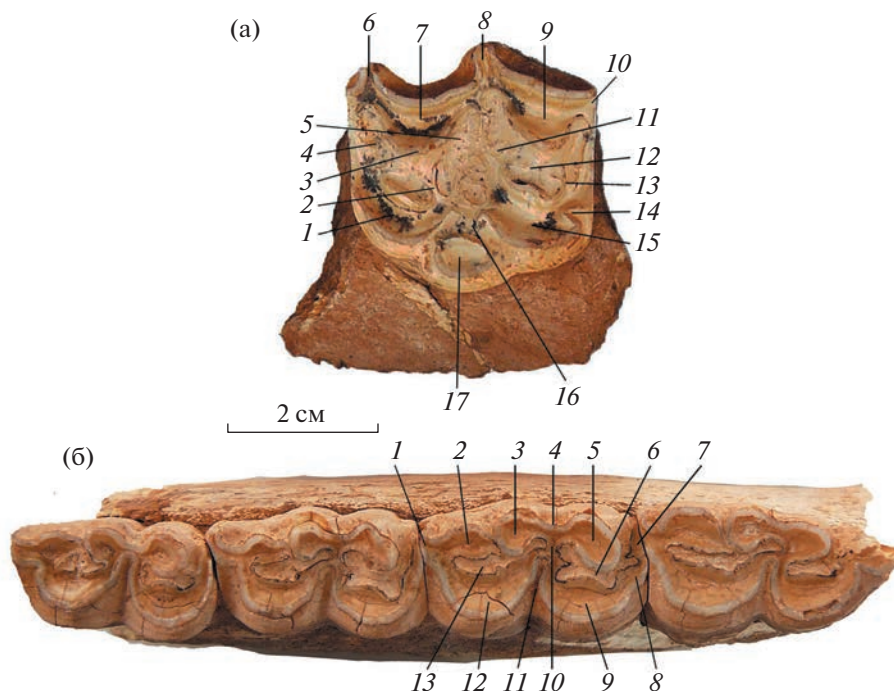


Рис. 3. Номенклатура и условные обозначения элементов верхних (а) и нижних (б) постоянных коренных зубов *H. ichioicum* из Западного Забайкалья (Удунга): А: P^3 (№ 987/733, ЮНЦ РАН): 1 – протолоф, 2 – складка протоконуля, 3 – передняя марка, 4 – складки протолофа, 5 – складки на задней стенке передней марки, 6 – парастиль, 7 – паракон, 8 – мезостиль, 9 – метакон, 10 – метастиль, 11 – складки на передней стенке задней марки, 12 – задняя марка, 13 – складка гипостилия, 14 – задняя бухта, 15 – гипокон, 16 – pli saballin, 17 – протокон; Б: P_2-M_1 (№ 987/50, ЮНЦ РАН): 1 – гипоконулид, 2 – энтоконид, 3 – метастилид, 4 – выемка двойной петли, 5 – метаконид, 6 – метафлексид, 7 – парастилид, 8 – параконулид, 9 – протоконид, 10 – шейка двойной петли, 11 – наружная долинка, 12 – гипоконид, 13 – задняя внутренняя долинка.

тодика, которой пользуются для морфологического их отображения, — довольно неточный инструмент в навигации по морфологии остатков этих ископаемых животных: она иногда может завести исследователя слишком далеко. Например, признак “относительно узкий” протокон с позиции топологии не означает, что эту или иную морфоструктуру можно легко представить. Он обозначает только то, что морфоструктура обладает теми или иными свойствами, перечисленными в определении. В этой связи для получения наиболее четкого представления о морфологии жевательной поверхности полных рядов зубов верхней и нижней челюсти, изображенных на рис. 2, номенклатура и условные обозначения элементов их морфологии приведены на P^3 и P_2-M_1 (рис. 3).

Остеологический материал из Удунги принадлежал довольно крупному гиппариону с умеренно гипсодонтными зубами, с коротким и широким (круглым) протоконом и слабой складчатостью эмали слабая. На задней стенке передней марки и передней стенке задней марки она достигала максимума, pli saballin присутствует и доходит на стертых зубах до протокона. Цемент име-

ется, за счет него коронка передне- и заднекоренных зубов усиливалась в лингвально-лабиальном направлении.

Нижние коренные зубы с почти симметричной двойной петлей гиппарионового типа, дно ее U-образное. Метаконид и метастилид овальные. Наружная долинка на премолярах не заходит в шейку двойной петли, на молярах — входит. Эмаль равномерно толстая. Латеральные стенки протокониды и гипокониды сильно выпуклы в лабиальном направлении. Такая форма конидов и значительный слой цемента (до 4.0 мм), особенно на премолярах, увеличивали площадь жевательной поверхности не только заднекоренных, но и переднекоренных зубов нижней челюсти.

Для чикойского гиппариона, как и других гиппарионинов, характерна “моляризация” переднекоренных зубов, как нижней, так и верхней челюсти. Переднекоренные, участвовавшие лишь в захватывании и удержании, отчасти и в разрезании пищи, были устроены несколько проще заднекоренных, служивших для измельчения пищи. Считается [1, 3], что в течение эволюции ландшафтов стали доминировать парковые или степные пространства с преобладанием грубой абра-

живной растительности, площади жевательной поверхности заднекоренных зубов уже было недостаточно для измельчения требуемого количества растительности. Переднекоренные стали приобретать сходное с заднекоренными строение, т.е. моляризоваться. На премолярах гиппариона из Удунги площадь окклюзионной поверхности преобладает над жевательной поверхностью моляров, что косвенно может указывать на широкое развитие открытых пространств на Хамардабанском поднятии, однако присутствие в фауне у подножия Хамбинского хребта большого числа лесных форм не позволяет полностью согласиться с такой реконструкцией биоценотического покрова, что, в свою очередь, подтверждает и слабая складчатость эмали на зубах гиппариона из Удунги.

Таким образом, наличие значительного слоя цемента на лабиальной и лингвальной сторонах коронки зубов и сильная выпуклость протокониды и гипокониды в лингвальном направлении становятся одними из главных отличительных черт *H. tchicoicum*, по которым они отличаются от других видов трехпалых лошадей. Они в сочетании с другими предоставляют возможность достаточно корректно проводить его идентификацию и выявлять истинное разнообразие гиппарионов на той или иной территории.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жегалло В.И. Гиппарионы Центральной Азии. М.: Наука, 1978. 156 с.
2. Иваньев Л.Н., Флоренсов Н.А. Находка остатков гиппариона в долине р. Чикой // Тр. Вост.-Сиб. филиала АН СССР. 1958. Вып. 8. Сер. геол. С. 63–83.
3. Иваньев Л.Н. К вопросу стратиграфического расчленения кайнозойских красноцветов Западного Забайкалья по данным палеонтологии // Изв. Вост.-Сиб. отдела Географического об-ва СССР. 1966. Т. 65. С. 82–94.
4. Вангенгейм Э.А., Беляева Е.И., Гарутт В.Е., Дмитриева Е.Л., Зажигин В.С. Млекопитающие эоплейстоцена Западного Забайкалья. М.: Наука. 1966. 164 с.
5. Калмыков Н.П. Необычный комплекс древних млекопитающих на юге Восточной Сибири // Байкальский зоологический журнал. 2022. № 1 (31). С. 38–45.
6. Калмыков Н.П. Находка раннеплиоценовых окаменелостей трехпалой лошади (*Hipparion tchicoicum* Ivanjev, 1966) в Западном Забайкалье // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2021. Т. 496. № 1. С. 213–216.
<https://doi.org/10.31857/S268673892101011X>
7. Eisenmann V., Alberdi M. T., de Giuli C., et al. “Studying Fossil Horses. Volume I – Methodology” // Collected Papers After the New York International Hipparion Conference 1981, eds M.O. Woodburne and P.Y. Sondaar. Leiden: Brill Press, 1988. P. 1–71.
8. Hulbert R. C. *Cormohipparion* and *Hipparion* (Mammalia, Perissodactyla, Equidae) from the late Neogene of Florida // Bull. Florida State Mus., Biol. Sci. 1988. Vol. 33. № 5. P. 229–338.

NEW DATA ON DENTAL MORPHOLOGY OF *HIPPARION TCHICOICUM* IVANJEV, 1966 FROM WESTERN TRANSBAIKALIA (RUSSIA)

N. P. Kalmykov^{a, #}

^a Federal Research Center Southern Scientific Center of Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, Russian Federation

[#] e-mail: kalm@ssc-ras.ru

Presented by Academician of the RAS G.G. Matishov

The message is devoted to the morphological features of the teeth of a three-toed horse (*Hipparion tchicoicum*) from the Pliocene of Western Transbaikalia (Russia). For the first time, it presents a number of diagnostic signs of the Chicoi hipparion, which are criteria for determining this taxon among other fossils of three-toed horses and their real diversity at the final stage of distribution in Inner Asia.

Keywords: Pliocene, mammals, *Hipparion tchicoicum*, Udunga, Western Transbaikalia

УДК 591.4

ОРГАНИЗАЦИЯ ЦЕРАТЫ ГОЛОЖАБЕРНОГО МОЛЛЮСКА
PTERAEOLIDIA SEMPERI (GASTROPODA, NUDIBRANCHIA)© 2023 г. О. А. Воробьева^{1,*}, И. А. Екимова¹, академик РАН В. В. Малахов¹

Поступило 15.09.2022 г.

После доработки 05.10.2022 г.

Принято к публикации 06.10.2022 г.

Исследовано строение церат и кнidosоков голожаберного моллюска *Pteraeolidia semperi* (Bergh, 1870). От гастродермального канала пищеварительной железы отходят тонкие трубочки, содержащие клетки с симбиотическими водорослями-зооксантеллами, тогда как в кнidosоке содержатся крупные клептокниды. Таким образом, *P. semperi* представляет собой уникальный пример симбиотрофного питания. Организация их церат и пищеварительной железы демонстрирует морфологические приспособления к культивированию зооксантелл и обеспечению активного фотосинтеза симбиотическими водорослями.

Ключевые слова: моллюски, морфология, симбиоз, зооксантеллы, клептокниды

DOI: 10.31857/S2686738922600558, **EDN:** MLNHTJ

Голожаберные моллюски — необычная группа морских брюхоногих моллюсков, лишенных раковины. На спинной стороне многих представителей *Nudibranchia* имеются выросты, выполняющие функцию вторичных жабр. У моллюсков из инфраотряда *Aeolidida* такие выросты (цераты) имеют еще и защитную функцию. В них заходят дивертикулы пищеварительной системы, по которым в апикальную часть цераты транспортируются стрекательные капсулы съеденных моллюском книдарий [1–4]. Однако у некоторых представителей *Nudibranchia* в цератах обнаружены симбиотические одноклеточные водоросли — зооксантеллы [5]. Как правило, зооксантеллы встречаются у моллюсков, лишенных клептокнид [6–8], но иногда цераты содержат и клептокниды, и зооксантеллы [9]. Данное явление обнаружено у представителей рода *Pteraeolidia* [9]. Род *Pteraeolidia* формально включает в себя два вида: *Pteraeolidia ianthina* (Angas, 1864) и *P. semperi* (Bergh, 1870), однако недавнее молекулярно-генетическое исследование показало, что вид *P. semperi*, в действительности, является комплексом видов, которые пока остаются неописанными [10].

Цель настоящей работы — описать организацию церат одного из представителей видового комплекса *P. semperi*, цераты которого содержат и клептокниды, и зооксантеллы.

Особь *P. semperi* были собраны в 2017 г. в Южном Вьетнаме, провинция Ня Чанг, в окрестностях острова Мот (глубина 16 м, координаты: 12°10'29.20" С 109°16'18.47" В) при помощи легководолазной техники. Материалом служили цераты, отсеченные от живых особей, наркотизированных 7.5%-м раствором хлористого магния, и помещенные в фиксатор. Для проведения гистологических и ультраструктурных исследований материал был зафиксирован в 2.5% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере. Для проведения иммунно-цитохимических исследований фиксатором послужил 4% раствор параформальдегида на морской воде. Для изучения мускулатуры использовалось окрашивание флуоресцентными красителями Alexa Fluor® 647 Phalloidin (окрашивает фибриллярный актин) ("ThermoFisher Scientific", США) и иодидом пропидия (окрашивает ядра) ("Sigma-Aldrich", США). Для выявления аморфного хитина использовали окрашивание флуоресцентным красителем Calcofluor White ("Sigma-Aldrich").

У исследуемого вида цераты собраны в пучки, по 5–15 штук. Каждая церата представляет собой уплощенный вырост, сужающийся апикально. Снаружи церата одета тонким, складчатым эпидермисом, толщиной от 8 до 15 мкм (рис. 1). Клетки эпидермиса заполнены вакуолями с уплощенными хитиновыми гранулами (рис. 2). Обилие хитиновых гранул в эпидермисе обуславливает его яркое свечение при исследовании на конфокальном лазерном микроскопе при окрашивании красителем CalcoFluor White (рис. 2a). Эпителий по-

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

*e-mail: olgavorobyeva.95@gmail.com

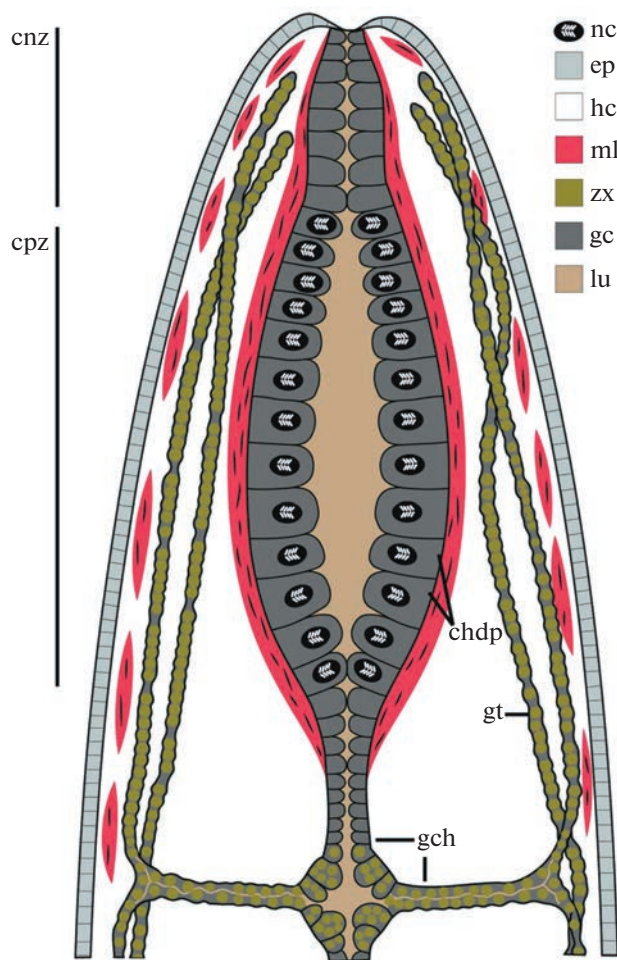


Рис. 1. Схема продольного среза цераты *Pteraeolidia semperi*. Обозначения: cnz — зона книдопора; cndp — книдофаг; cpz — зона книдофагов; ep — эпидермис; gc — гастродермальные клетки; gch — гастродермальный канал; gt — gastrodermal tenia — гастродермальный тяж; hc — гемоцель; lu — просвет пищеварительной железы; ml — мышечные пучки; nc — клептокниды в книдофагах; zx — зооксантеллы в клетках пищеварительной железы.

достлан толстой и складчатой базальной пластинкой, толщина которой составляет 1 мкм. Изнутри к базальной пластинке прилегает мышечный слой, состоящий преимущественно из клеток продольной мускулатуры (рис. 2а, в).

По оси цераты проходит тонкий гастродермальный канал — вырост пищеварительной железы. В апикальной части цераты этот канал расширяется, формируя книдосак (рис. 1). На большей части протяжения цераты гастродермальный канал практически лишен мускулатуры, тогда как книдосак имеет мощную мышечную обкладку, образованную переплетением мышечных пучков, идущих в различных направлениях. Книдосак подразделяется на две части: расширенную базальную — зона книдофагов, и суженую апикаль-

ную — зона книдопора (рис. 2а, в). Внутренняя выстилка базальной части книдосака представлена крупными гастродермальными клетками — книдофагами (рис. 2а, б). Для вида *P. semperi* характерно то, что каждый книдофаг содержит только одну клептокниду (рис. 2б). Книдофаги представляют собой крупные клетки, цитоплазма которых дифференцирована на центральную часть, содержащую многочисленные везикулы и большинство клеточных органелл, включая ядро, и периферическую — бедную органеллами (рис. 2в). Клептокниды представляют собой овальные тельца 10×20 мкм, расположенные в наполненной везикулами части цитоплазмы. На ТЭМ изображениях они имеют толстую, электронно-прозрачную оболочку и электронно-плотное внутреннее содержимое, в котором хорошо различима свернутая в спираль стрекательная нить (рис. 2б). Клептокниды помещаются в вакуоль, мембрана которой тесно прилегает к стенке клептокниды и различима только в некоторых местах. Гастродермальная выстилка апикальной части книдосака не содержит клептокнид (рис. 2а).

Апикальная часть книдосака открывается книдопором на вершине цераты. Здесь гастродермальный эпителий выстилки книдосака контактирует с внешней средой. Очевидно, что книдопор служит для выбрасывания во внешнюю среду клептокнид, которые обеспечивают защиту голожаберного моллюска от врагов.

Пространство между тонким гастродермальным выростом и стенкой цераты представлено обширным гемоцелом (рис. 1 и 2в). На проходящем по оси цераты выросте пищеварительной железы (ниже книдосака) периодически располагаются вздутия. От этих вздутий под прямым углом, пересекая гемоцель, отходят тонкие гастродермальные каналы. Достигая стенки тела, они дают начало еще более тонким гастродермальным тяжам, идущим в апикальную и базальную части цераты (рис. 1). Эти тяжи не имеют выраженной полости, непосредственно прилегают к слою мускулатуры, и иногда проникают между мышечными пучками, в отдельных местах образуют вздутия. Гастродермальные клетки этих каналов содержат в цитоплазме многочисленные зооксантеллы (рис. 2в). Последние представляют собой округлые клетки, диаметр которых составляет 7–8 мкм, и в которых можно различить ядро, хлоропласт и другие органеллы (рис. 2в). Каждая зооксантелла находится в фагоцитарной вакуоли.

Терминальные гастродермальные тяжи имеют толщину 7–9 мкм, в них отсутствует просвет. Выраженная базальная пластинка, которая бы отделяла гастродермальные каналы от гемоцеля, отсутствует. Лишь в отдельных участках удается видеть мелко гранулярный материал, который,

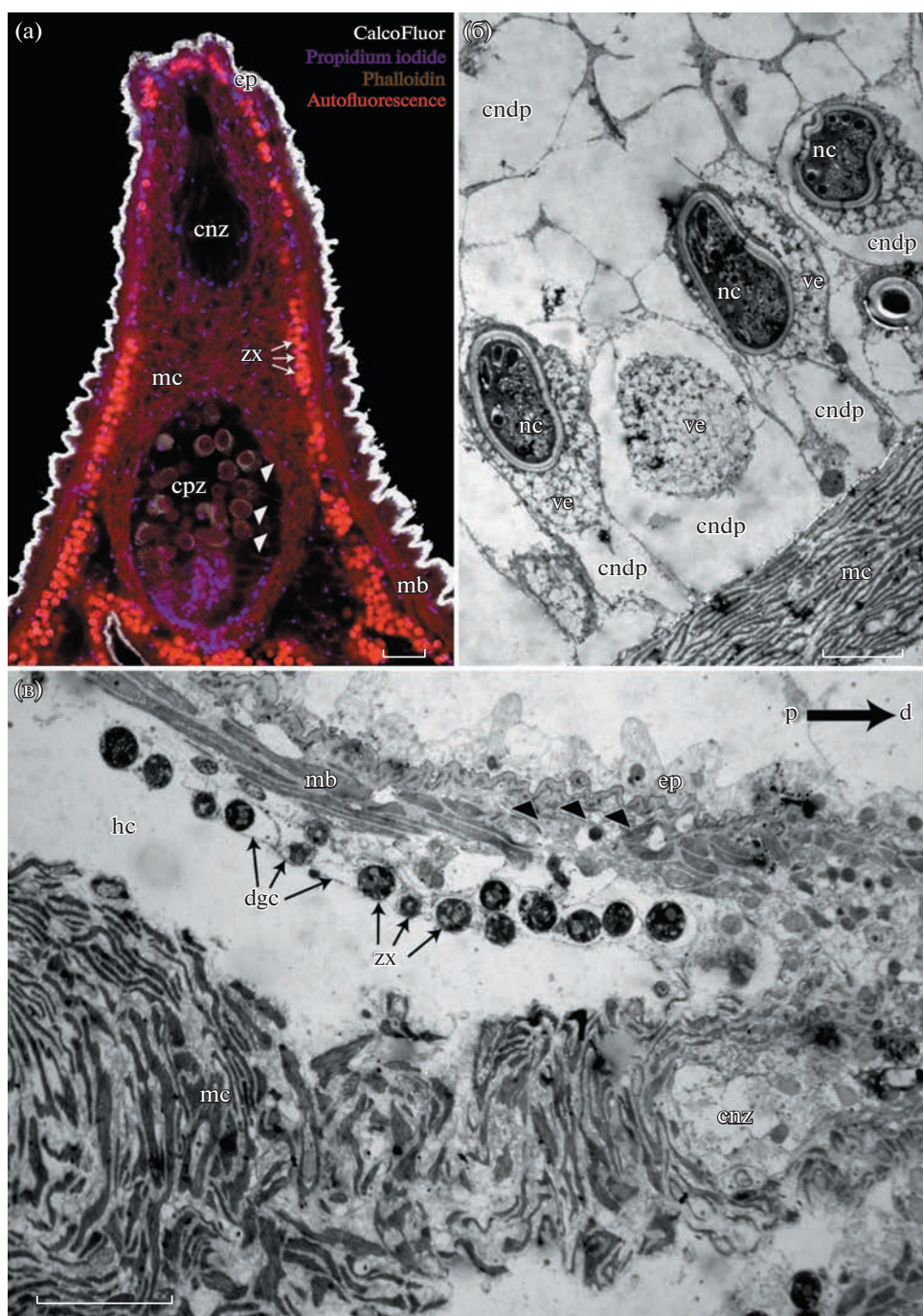


Рис. 2. Тонкое строение апикальной части цераты. а — продольный оптический срез через кнidosак (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, белыми треугольниками отмечены клетокниды). б — продольный ультратонкий срез через зону книдофагов (трансмиссионная электронная микроскопия, ТЭМ). в — продольный ультратонкий срез через апикальную часть кнidosака (ТЭМ, черными треугольниками отмечена базальная пластинка эпидермиса, стрелка в правом верхнем углу обозначает дистальный конец кнidosака). Обозначения: cnz — зона книдопора; cndp — книдофаг; cpz — зона книдофагов; dgс — клетки пищеварительной железы; ep — эпидермис; hc — гемоцель; mb — мускулатура стенки тела; mc — мускулатура кнidosака; nc — нематоциты в книдофагах (клетокниды); ve — везикулы; zx — зоосантеллы. Масштабные линейки: а, с — 30 мкм; в — 10 мкм.

возможно, представляет собой остатки истонченной базальной пластинки. Такой же мелкогранулярный материал можно наблюдать на плазмолемме мышечных клеток.

Представители рода *Pteraeolidia* — это уникальный пример одновременной клетокнидии и клеткопластии среди голожаберных моллюсков. Большинство видов голожаберных моллюсков

вообще не имеют в тканях симбиотических водорослей [11, 12]. Среди тех видов, у которых в тканях обнаруживаются зооксантеллы, можно выделить три группы [9]. К первой группе относятся виды, у которых зооксантеллы некоторое время существуют в клетках пищеварительной железы, но используются преимущественно как пищевой ресурс и рано или поздно перевариваются. Ко второй группе относятся виды, у которых с зооксантеллами устанавливаются мутуалистические отношения. Зооксантеллы живут в клетках пищеварительной железы, фотосинтезируют, но при этом пищеварительная железа не демонстрирует каких-либо специальных морфологических приспособлений для культивирования симбионтов. Можно предполагать, что в таких случаях сахара, образуемые зооксантеллами, используются для питания хозяина, в то время как основным источником пищи являются ткани кораллов и гидроидных полипов.

Представители рода *Pteraeolidia* относятся к третьей группе. Организация их церат и пищеварительной железы демонстрируют морфологические приспособления к культивированию зооксантелл и обеспечению ими активного фотосинтеза. Цераты располагаются пучками, на специальных базальных выростах, что снижает их перекрывание. Зооксантеллы располагаются в тонких разветвлениях гастродермальных каналов, которые пересекают гемоцель и прилегают к стенке тела. Эпидермис церат *P. semperi* гораздо тоньше, чем у других голожаберных моллюсков [3, 13].

Биология представителей рода *Pteraeolidia* изучена плохо. Эти моллюски живут в рифовых сообществах тропических морей, но их редко находят на самих кораллах. Как правило, эти моллюски обнаруживаются на открытых участках дна, не занятых поселениями кораллов [9, 14]. В экспериментальных условиях *P. semperi* способна длительное время существовать вообще без животного питания, при этом фотосинтетическая активность зооксантелл не снижается [14]. Таким образом, можно предполагать, что симбиотрофное питание за счет зооксантелл имеет для *P. semperi* существенно большее значение, чем у других голожаберных моллюсков.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность Юрию Владимировичу Деарту (Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН) за предоставление материалов для данного исследования. Микроскопические исследования осуществлялись на оборудовании Межфакультетской лаборатории электронной микроскопии МГУ и Центра микроскопии ББС МГУ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование поддержано грантом РФФИ № 20-34-90106 “Сравнительная анатомия и механизм функционирования кнidosаков голожаберных моллюсков Nudibranchia (Mollusca: Gastropoda)”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Greenwood P.G. Acquisition and use of nematocysts by cnidarian predators // *Toxicon*. 2009. V. 54. № 8. P. 1065–1070.
2. Vorobyeva O.A., Ekimova I.A., Malakhov V.V. The structure of cnidosacs in nudibranch mollusc *Aeolidia papillosa* (Linnaeus, 1761) and presumable mechanism of nematocysts release // *Doklady Biological Sciences*. 2017. V. 476. № 1. P. 196–199.
3. Vorobyeva O.A., Malakhov V.V., Ekimova I.A. General and fine structure of *Aeolidia papillosa* cnidosacs (Gastropoda: Nudibranchia) // *Journal of Morphology*. 2021. V. 282. № 5. P. 754–768.
4. Goodheart J.A., Bely A.E. Sequestration of nematocysts by divergent cnidarian predators: mechanism, function, and evolution // *Invertebrate Biology*. 2017. V. 136. № 1. P. 75–91.
5. Burghardt I., Evertsen J., Johnsen G., et al. Solar powered sea slugs – mutualistic symbiosis of aeolid Nudibranchia (Mollusca, Gastropoda, Opisthobranchia) with *Symbiodinium* // *Symbiosis*. 2005. V. 38. P. 227–250.
6. Wägele M., Johnsen G. Observations on the histology and photosynthetic performance of “solar-powered” opisthobranchs (Mollusca, Gastropoda, Opisthobranchia) containing symbiotic chloroplasts or zooxanthellae // *Organisms Diversity & Evolution*. 2001. V. 1. № 3. P. 193–210.
7. Burghardt I., Gosliner T.M. *Phyllodesmium rudmani* (Mollusca: Nudibranchia: Aeolidioidea), a new solar powered species from the Indo-West Pacific with data on its symbiosis with zooxanthellae // *Zootaxa*. 2006. V. 1308. № 1. P. 31–47.
8. Burghardt I., Wägele H. A new solar powered species of the genus *Phyllodesmium* Ehrenberg, 1831 (Mollusca: Nudibranchia: Aeolidioidea) from Indonesia with analysis of its photosynthetic activity and notes on biology // *Zootaxa*. 2004. V. 596. № 1. P. 1–18.
9. Rudman W.B. The taxonomy and biology of further aeolidacean and arminacean nudibranch molluscs with symbiotic zooxanthellae // *Zoological Journal of the Linnean Society*. 1982. V. 74. № 2. P. 147–196.
10. Wilson N.G., Burghardt I. Here be dragons-phylogeography of *Pteraeolidia ianthina* (Angas, 1864) reveals multiple species of photosynthetic nudibranchs (Aeolidina: Nudibranchia) // *Zoological Journal of the Linnean Society*. 2015. V. 175. № 1. P. 119–133.
11. Wägele H. Potential key characters in Opisthobranchia (Gastropoda, Mollusca) enhancing adaptive radiation //

- Organisms Diversity & Evolution. 2004. V. 4. № 3. P. 175–188.
12. *Wägele H., Raupach M.J., Burghardt I., et al.* Solar-powered sea slugs (Opisthobranchia, Gastropoda, Mollusca): incorporation of photosynthetic units: a key character enhancing radiation? // *Evolution in action*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2010. P. 263–282.
 13. *Goodheart J.A., Bleidißel S., Schillo D., et al.* Comparative morphology and evolution of the cnidosac in Cladobranchia (Gastropoda: Heterobranchia: Nudibranchia) // *Frontiers in zoology*. 2018. V. 15. № 1. P. 1–18.
 14. *Burghardt I., Stemmer K., Wägele H.* Symbiosis between *Symbiodinium* (Dinophyceae) and various taxa of Nudibranchia (Mollusca: Gastropoda), with analyses of long-term retention // *Organisms Diversity & Evolution*. 2008. V. 8. № 1. P. 66–76.

MORPHOLOGICAL ORGANIZATION OF CERATA IN A NUDIBRANCH *PTERAEOLIDIA SEMPERI* (GASTROPODA, NUDIBRANCHIA)

O. A. Vorobyeva^{a, #}, I. A. Ekimova^a, and academician of the RAS V. V. Malakhov^a

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

[#] *e-mail: olgavorobyeva.95@gmail.com*

The morphology of cerata and cnidosacs of nudibibranch mollusc *Pteraeolidia semperi* (Bergh, 1870) has been studied. From gastrodermal channel of the digestive gland the fine tubules arise, which contains cells with symbiotic algae – zooxanthellae. The cnidosac stores large kleptocnides. Thus, *P. semperi* represents a unique example of symbiotrophic feeding specialization. Morphological organization of its cerata and the digestive gland demonstrates several adaptation for cultivation of zooxanthellae providing proper conditions for active photosynthesis of zooxanthellae.

Keywords: molluscs, morphology, symbiosis, zooxanthellae, kleptocnides

УДК 574.3:599.735.31

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ЭКОЛОГИЯ ЛЕСНОГО СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ (*RANGIFER TARANDUS VALENTINAE* Flerov, 1932) КУЗНЕЦКОГО АЛАТАУ

© 2023 г. А. А. Васильченко¹, С. В. Найдено², М. Д. Чистополова², академик РАН В. В. Рожнов^{2,*}

Поступило 30.08.2022 г.

После доработки 15.09.2022 г.

Принято к публикации 16.09.2022 г.

Впервые приведены сведения о размерах участка обитания сибирского лесного северного оленя (*Rangifer tarandus valentinae*) алтае-саянской популяции Кузнецкого Алатау, минимальном расстоянии, которое проходит олень за сутки, их изменениях и смене мест обитания в течение годового цикла. Обсуждаются возможные причины цикличности использования местообитаний лесным северным оленем.

Ключевые слова: сибирский лесной северный олень, *Rangifer tarandus valentinae*, алтае-саянская популяция, Кузнецкий Алатау, пространственная экология, участок обитания, сезонные миграции

DOI: 10.31857/S2686738922700056, **EDN:** MUGGYN

Сведений о биологии алтае-саянской популяции сибирского лесного северного оленя, *Rangifer tarandus valentinae* Flerov, 1932, одного из четырех занесенных в Красную книгу Российской Федерации подвидов [1], особенно об использовании им местообитаний, размерах участков обитания и перемещениях, крайне мало. В настоящее время сибирский лесной северный олень, в прошлом широко населявший все горно-таежные типы угодий с высотами от 500 м н.у.м. горной системы Кузнецкого Алатау, самого западного участка ареала подвида, сохранился главным образом в границах заповедника “Кузнецкий Алатау” [2, 3].

Ранее нами впервые было показано своеобразие алтае-саянской популяции сибирского лесного северного оленя Кузнецкого Алатау, которое проявляется в существовании уникальных митохондриальных линий, отсутствии признаков интрогрессии мтДНК домашних оленей [4]. Нами было выявлено всего две замены нуклеотидов в исследованной выборке, нуклеотидное разнообразие оказалось почти на порядок ниже, чем у большинства популяций диких северных оленей России и сопоставимо с таковым лишь в отдельных группировках дикого северного оленя Норвегии и Шпицбергена.

В годовом жизненном цикле сибирского лесного северного оленя выделяются два наиболее заметных периода — гон, который происходит осенью, и отел, который происходит в начале лета; распределение оленей в разных местообитаниях, о чем свидетельствуют их встречи, меняется в соответствии с этими периодами [5]. О миграциях и размерах участков обитания этого подвида северного оленя информации недостаточно, представления об особенностях его пространственной экологии строятся главным образом на данных, которые относятся к другому подвиду — лесному северному оленю европейской части России (*R. t. tarandus*) [6].

Целью данной работы было изучение перемещений северных оленей на территории заповедника “Кузнецкий Алатау” с помощью спутникового ошейника, а также сезонной смены местообитаний оленями.

Самка лесного северного оленя была помечена спутниковым ошейником “Пульсар” (АНО “Эс-Пас”, Россия) системы Argos 4.08.2017 г. в верховьях р. Кибрас (правый приток р. Уса). Ошейник “Пульсар” был настроен на работу в заранее заданные, фиксированные в течение каждых суток, периоды, которые определяются по пролетам спутников Argos в месте исследования (нами были определены 4 таких периода). При наступлении каждого периода в течение отведенного времени GPS ошейника берет географические координаты, а трансмиттер начинает попытки их отправки. В результате на спутник могут прийти несколько сообщений с одинаковыми координатами. Поэтому перед началом пространственного

¹ Государственный природный заповедник “Кузнецкий Алатау”, Междуреченск, Россия

² Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия

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

Таблица 1. Усредненные температурные данные (С°) для территории заповедника “Кузнецкий Алатау” (предгорья горы Каным)

Год	Месяц	Данные с ГМС “Ненастная” (пос. Приисковое, 1178 м н.у.м.)		
		Средняя	min	max
2017	Август	+7.8	+1.5	+23.6
2017	Сентябрь	+6.5	–1.7	+21.7
2017	Октябрь	+2.4	–12.4	+17.4
2017	Ноябрь	–11.1	–20.4	+2.7
2017	Декабрь	–10.0	–19.0	+2.0
2018	Январь	–15.9	–28.8	+1.9
2018	Февраль	–13.5	–24.3	+1.8
2018	Март	–6.3	–16.8	+10.9
2018	Апрель	–0.5	–11.8	+11.4
2018	Май	+4.7	–5.9	+19.2
2018	Июнь	+15.4	–2.0	+24.9
2018	Июль	+15.3	+5.3	+25.8
2018	Август	+11.0	0.0	+22.9

анализа во избежание псевдорепликации данные отфильтровываются, оставляя одну первую локацию на каждый период работы ошейника в течение суток. В итоге мы получаем 4 локации в сутки, взятые примерно в одно и то же время каждый день.

Ошейник самки северного оленя передавал координаты с 4.08.2017 г. до 21.09.2018 г., всего он передал 17405 локаций, после фильтрации осталось 1105 уникальных равномерно распределенных во времени локаций, 1008 из которых приходятся на полный годовой цикл.

Участок обитания помеченной спутниковым ошейником самки построен по GPS-локациям, полученным за годовой цикл в период с 1.09.2017 г. по 31.08.2018 г. На основе GPS-локаций методами максимального выпуклого полигона (MCP100%) и kernel (Fixed kernel 95%) [7, 8] определяли размеры участка обитания. Внутренняя структура была оценена с помощью выявления реальной ядерной зоны участка обитания [9].

Кроме того, мы рассчитывали минимальное суточное расстояние, пройденное самкой оленя, которое мы определяем как длину линии, последовательно соединяющей локации в течение суток. Поскольку в течение периода исследования были частые случаи пропусков локаций, что могло быть связано с горными условиями и недостаточным углом обзора неба над ошейником для установления связи со спутником, не все данные были пригодны для расчета минимального пройденного расстояния. Мы отобрали только те дни, для которых были доступны 3 или 4 локации, а время суток последней локации было примерно (± 3 ч) таким, как и в предыдущие сутки (измере-

ние начиналось от последней локации предыдущих суток и заканчивалось на последней локации текущих). В результате за годовой цикл мы выделили 131 сутки, удовлетворяющие таким условиям.

Для анализа динамики использования пространства и перемещений оленя весь период исследований мы разбили на четыре сезона — осень (сентябрь—ноябрь), зима (декабрь—февраль), весна (март—май) и лето (июнь—август). Температурный режим в районе исследований помещаю представлен в табл. 1.

Снежный покров в районе исследований обычно устанавливается с 15 сентября, а к 15 июня на большей части территории снег практически полностью сходит, оставаясь лишь на некоторых (из года в год постоянных) участках до следующей зимы. Высота снежного покрова зависит от высоты местности [10] и различается на разных участках: в долинах рек она достигает 250–300 см, на склонах гор, покрытых лесом — 220 см, в каменистой горной тундре имеются участки, свободные от снега.

Размеры участка, использованного оленем в течение года, определенные методом MCP100%, составили 784 км², методом kernel95% — 586 км² (рис. 1). Структура его, выявленная методом kernel, имеет кольцевидную форму, в ней можно выделить шесть ядерных зон, где самка оленя находилась достаточно продолжительное время, общая площадь которых, определенная методом kernel70%, составила 153 км². Для того чтобы оценить среднюю географическую протяженность этого “кольца”, мы соединили последовательно центры кластеров ядерных зон годового участка

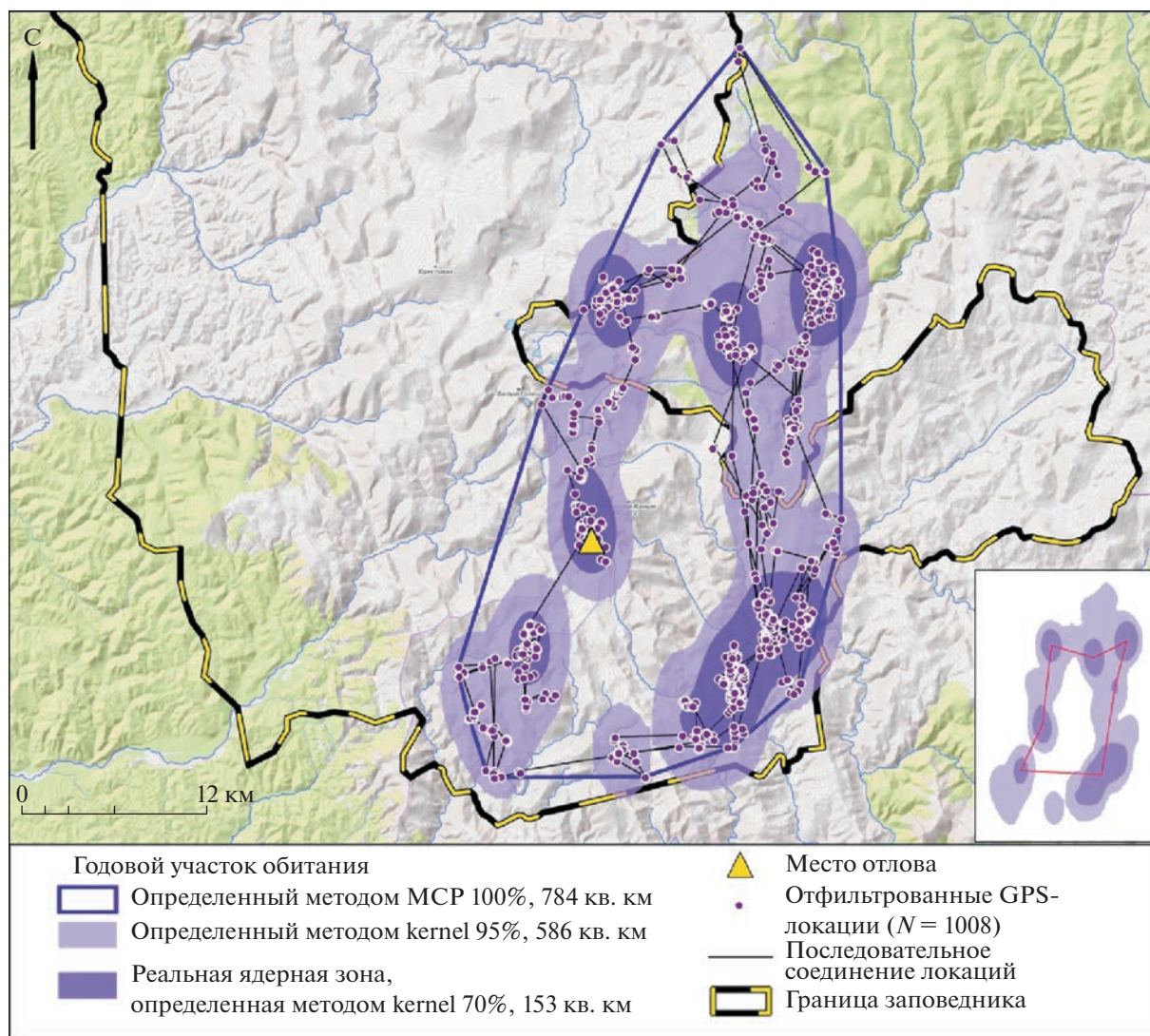


Рис. 1. Размеры и структура годового участка обитания самки северного оленя, помеченной ошейником.

(см. врезку на рис. 1). Периметр полученной фигуры составил 77 км. Таким образом, в течение года самка северного оленя (и вероятно вся группа оленей, в которую она входила) последовательно перемещалась по часовой стрелке вокруг горного массива Каным по эллипсоподобной траектории географической протяженностью около 77 км, в разные сезоны на более или менее длительное время останавливаясь на отдельных участках. В конце июля-начале августа 2019 г. помеченная нами самка оленя была вновь зарегистрирована с группой оленей фотоловушка, установленной в месте ее мечения в 2017 г., и, таким образом, по-видимому, второй раз прошла по тому же маршруту.

Анализ динамики использования самкой оленя территории заповедника показал, что в разные сезоны года площадь ее участка обитания различ-

на, при этом в осенне-зимний период границы участка выходят за пределы заповедника “Кузнецкий Алатау” (рис. 2). Осенью площадь участка обитания составила 373 км² (МСР100%) и 292 км² (kernel95%), а реальная ядерная зона 43 км² (kernel70%), зимой соответственно 453, 341 и 48, весной — 156, 109 и 48 км², летом — 59, 49 и 15 км². Таким образом, летом участок обитания самки оленя был наименьшим по площади, зимой — максимальным. При этом площадь реальной ядерной зоны во все сезоны, кроме лета, была примерно одинакова (43–49 км²), а летом она, как и площадь всего участка обитания, также была минимальной — втрое меньшей.

Результаты расчета минимального пройденного за сутки расстояния в разные сезоны года представлены в табл. 2.

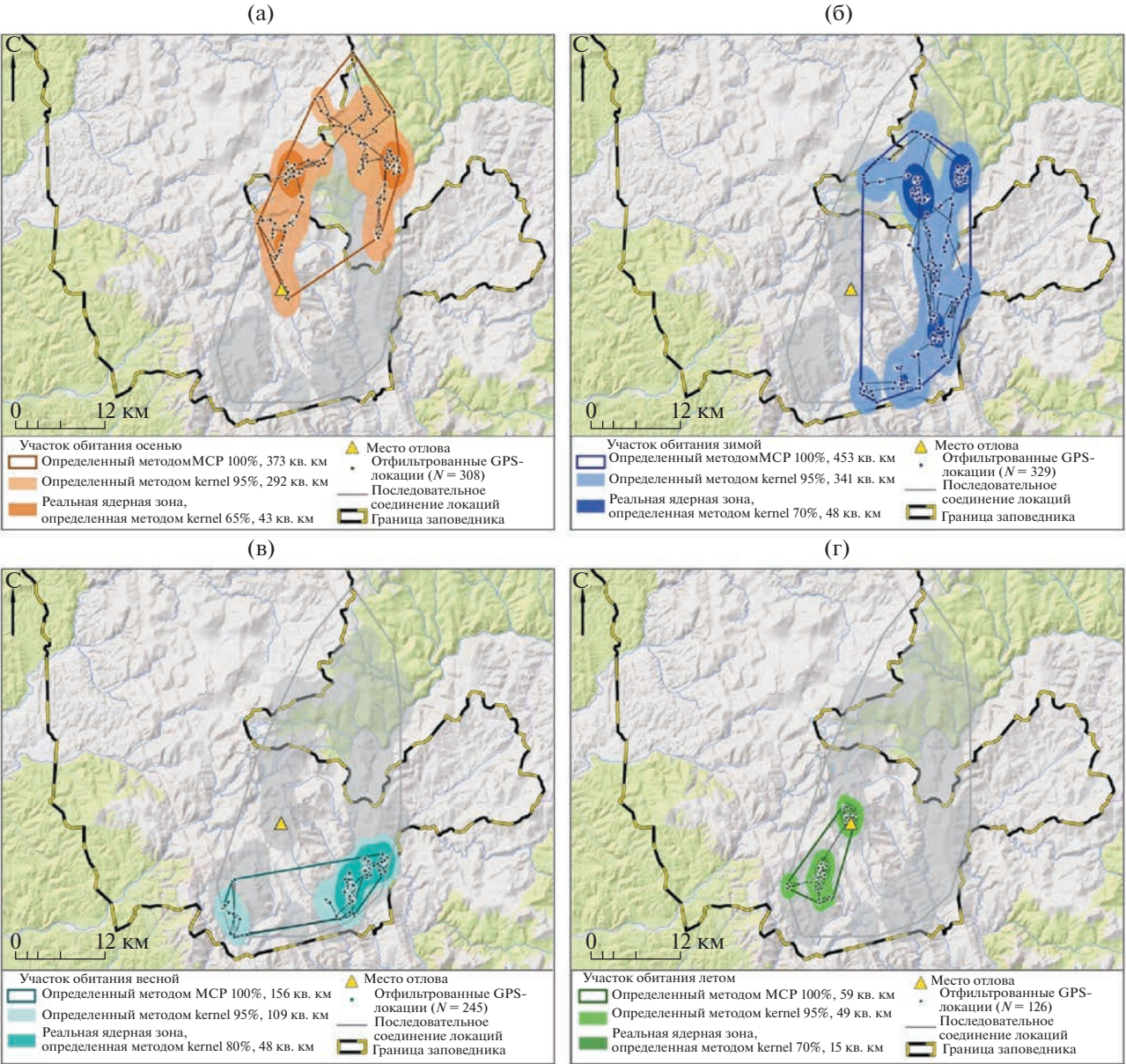


Рис. 2. Размеры и структура участка обитания самки северного оленя в разные периоды года: а – осенью (1.09.2017–30.11.2017); б – зимой (1.12.2017–28.02.2018); в – весной (1.03.2018–31.05.2018); г – летом (1.06.2018–31.08.2018).

Среднее минимальное пройденное суточное расстояние значимо не отличается в разные сезоны годы (Kruskal–Wallis test, $K = 2.886$, $p = 0.4095$), и, соответственно, попарное сравнение сезонов также не дало достоверных отличий (post

hoc Dunn’s multiple comparisons test). Однако следует отметить, что зимой, когда среднее минимальное пройденное расстояние имеет самое высокое значение в течение года, медиана для этого сезона практически в два раза меньше. Это свиде-

Таблица 2. Минимальное пройденное за сутки расстояние (в км) самкой северного оленя в разные сезоны года

	Осень	Зима	Весна	Лето	Год
Число дней, n	39	20	55	17	131
Среднее $\pm$ SD	2.2 ± 1.5	3.2 ± 3.1	1.9 ± 2.1	2.0 ± 1.4	2.2 ± 2.1
Медиана	2.0	1.7	1.5	1.7	1.7

тествует о том, что зимой олень совершает длинные перемещения в одни дни, и проявляет обычную кормовую активность в другие. Это подтверждают и максимальные значения стандартного отклонения. Вероятно, небольшой разброс значений медиан для всех сезонов года отражает дни с типичной кормовой активностью. Минимум среднесуточных перемещений приходится на весну, но разница между средним и медианой — на втором месте после зимы, как и значения стандартного отклонения. Это может свидетельствовать о том, что беременные самки перед отелом перемещаются меньше, но до схода снега еще тратят много времени на поиск пастбищ. Кроме того, на конец мая приходится полученный нами рекорд суточного перемещения — 15,1 км. Возможно, это целенаправленный переход животного к месту отела. Летом и осенью суточные перемещения самки северного оленя более стабильны.

Местонахождение, состав и размер групп, которые образуют олени, различаются в разные периоды годового жизненного цикла [5]: осенью, во время гона (сентябрь—октябрь), взрослые самки и самцы держатся в горной тундре и объединяются в смешанные группы до 18 особей, в которых 3—4 самца; зимой (февраль—март) они спускаются в горно-лесной пояс, в поймы рек, продолжают держаться такими же группами; весной (начало мая) самцы начинают вести одиночный образ жизни или пастись небольшими группами, а беременные самки выделяются в отдельные группы и до отела пасутся близ водоемов и невдалеке от снежников, в начале лета (конец мая—июнь) происходит отел; летом (июль—август) олени продолжают держаться в районах со снежниками и ледниками, размер групп самок с телятами достигает 8 особей, взрослые самцы продолжают ходить по одиночке или группами из 2—3 особей, но могут быть встречены стада и из 20—30 оленей; к началу осени (сентябрь) олени перемещаются в горные тундры, формируются группы полувзрослых животных численностью до 12 особей, в которых могут быть и взрослые олени.

Помеченная нами самка северного оленя в момент мечения входила в группу из 14 животных, представлявшую одну из трех в разной степени изолированных группировок заповедника [2, 4] — самую крупную, *центральную*, обитающую на горных массивах Каным и Белый Голец, вершинах гор Соловей, Круглая, Столовая, Крестовая, хребтах между истоками рек Средняя Терсь, Изас, Кривая, Шат, Верхняя Терсь, хребте Чёрный Ворон, водоразделах между реками Верхняя Терсь, Чек-Су, Белая Уса, истоках реки Чёрный Июс, горном массиве с выдающейся вершиной горы Бобровой, истоках рек Избасы, Бобровая, Саргая. Поскольку для лесного северного оленя характерен групповой образ жизни, перемещения

помеченной самки в группе оленей могут отражать общие особенности пространственной экологии этого подвида, по крайней мере годовых перемещений группы самок.

Сопоставление пространственно-временных особенностей годового жизненного цикла сибирского лесного северного оленя с полученными нами данными об использовании пространства помеченной самки позволяет обсудить характер его динамики.

Осенью самка оленя, вероятно, вместе с группой ушла с места мечения в верховьях р. Кибрас (правый приток р. Уса) на север, за границы заповедника “Кузнецкий Алатау” на прилегающую территорию регионального природного заказника “Олений перевал” в Хакасии — в бассейн р. Чёрный Июс, где, по-видимому, участвовала в гоне, и оставалась там в течение сентября—октября. Зимой она вернулась на территорию заповедника по хребту Саргая, обойдя горный массив Каным с восточной стороны, пересекла долину р. Белая Уса и остановилась в юго-восточной части заповедника в междуречье рек Белая Уса и Кибрас, где провела практически весь весенний период. В конце этого периода самка быстро перешла через южные отроги горного массива Каным в междуречье рек Правая Чексу и Чексу, в самую южную часть заповедника. Там она, по-видимому, отелилась и затем все лето паслась в долине реки Правая Чексу. К концу лета самка вернулась на то место, где она была помечена ровно год назад — в верховья р. Кибрас, где была зарегистрирована фотоловушка. Таким образом, все перемещения самки и, вероятно, группы оленей происходили вокруг горного массива Каным по часовой стрелке. При этом главным образом использовались местообитания с мало- и среднесомкнутыми светлосвойными или темносвойными лесами на высотах около 900 м н.у.м., и лишь в период гона группа находилась в горной тундре на высотах 1300—1400 м н.у.м.

У лесного северного оленя европейской части России [6] в Восточной Фенноскандии миграции весной происходят в направлении на восток и юго-восток, осенью в обратном направлении — на запад и северо-запад, протяженность их небольшая, от 40 до 100 км, в среднем 62 км, в использовании летних и зимних участков обитания олени очень консервативны. Начинаются весенние миграции в начале апреля, в середине-конце мая (время отела) олени приходят на летние местообитания, в конце октября-начале ноября (окончание гона) начинаются осенние миграции и к середине декабря олени возвращаются на зимние местообитания.

Выявленная нами общая схема движения сибирского лесного северного оленя в Кузнецком Алатау представляет собой циклическое переме-

ние животного (и, возможно, группы особей) на протяжении годового жизненного цикла. При этом использование оленями сезонных местобитаний, по-видимому, в значительной степени определяется структурой растительных сообществ и особенностями снежного покрова, а также температурой воздуха, которая влияет на активность кровососущих насекомых: остающиеся в летний период года снежники привлекают оленей своей прохладой и меньшим количеством кровососущих насекомых на них, а большая глубина снежного покрова в поймах рек позволяет оленям использовать в качестве корма растущий на деревьях лишайник.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Ф. Мартусова за помощь в отло-
ве оленя.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке
Программы № 17 “Биоразнообразие природных си-
стем и биологические ресурсы России”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Красная книга Российской Федерации, том “Жи-
вотные”. 2-ое издание. М.: ФГБУ “ВНИИ Эколо-
гия”, 2021. 1128 с.
2. Смирнов М.Н. Северный олень на юге Сибири: мо-
нография. Красноярск: Сиб. федерал. ун-т, 2016.
231 с.
3. Панченко Д.В., Мизин И.А., Рожнов В.В. // Красная
книга Российской Федерации, том “Животные”.
2-е издание. М.: ФГБУ “ВНИИ Экология”, 2021.
С. 1020–1025.
4. Васильченко А.А., Холодова М.В., Баранова А.И.,
и др. // Доклады Российской академии наук. Нау-
ки о жизни. 2020. Т. 494. С. 522–526.
<https://doi.org/10.31857/S2686738920050224>
5. Васильченко А.А. // Северный олень в России,
1982–2003 гг. М.: Триада-фарм, 2003. С. 184–192.
6. Данилов П.И., Панченко Д.В., Тирронен К.Ф. Север-
ный олень Восточной Финляндии. Петрозав-
водск: КарНЦ РАН, 2020. 187 с.
7. Hayne D.W. // Journal of Mammalogy. 1949. V. 30.
P. 1–18.
8. Worton B.J. // Ecology. 1989. V. 70. P. 164–168.
9. Powell R.A. Animal home ranges and territories and
home range estimators. (Research techniques in animal
ecology). N.Y.: Columbia University Press, 2000.
442 p.
10. Адаменко М.М. // Известия АО РГО. 2019. № 3 (54).
С. 45–49.
<https://doi.org/10.24411/2410-1192-2019-15404>

SPATIAL ECOLOGY OF THE SIBERIAN FOREST REINDEER (*RANGIFER TARANDUS VALENTINAE* Flerov, 1932) OF THE KUZNETSK ALATAU

A. A. Vasilchenko^a, S. V. Naidenko^b, M. D. Chistopolova^b, and Academician of the RAS V. V. Rozhnov^{b, #}

^a State Nature Reserve “Kuznetsk Alatau”, Mezhdurechensk, 652888 Russia

^b A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

[#]e-mail: rozhnov-v-2015@yandex.ru

For the first time, information is provided on the size of the home range of the Siberian forest reindeer (*Rangifer tarandus valentinae*) of the Altai-Sayan population of the Kuznetsk Alatau, the minimum distance that the deer passes per day, their changes and changes of habitats during the annual cycle. Possible reasons for the cyclical use of the habitat by forest reindeer are discussed.

Keywords: Siberian forest reindeer, *Rangifer tarandus valentinae*, Altai-Sayan population, Kuznetsk Alatau, spatial ecology, home range, seasonal migrations

УДК 595.142.2:591.4

НАХОДКА ПОГОНОФОР (ANNELIDA, SIBOGLINIDAE) В ЖЕЛОБЕ СВЯТОЙ АННЫ (КАРСКОЕ МОРЕ) В РАЙОНЕ ДИССОЦИАЦИИ ГАЗОГИДРАТОВ

© 2023 г. Н. Н. Римская-Корсакова¹, Н. П. Карасева¹, А. А. Осадчиев²,
член-корреспондент РАН И. П. Семилетов³, М. М. Ганцевич^{1,*},
Д. А. Юрикова^{1,4}, академик РАН В. В. Малахов¹

В желобе Святой Анны на глубинах 539 и 437 м обнаружены представители погонофор (Annelida, Siboglinidae), жизнедеятельность которых обеспечивается симбиотическими хемоавтотрофными бактериями, окисляющими метан и сероводород. Находка погонофор свидетельствует о высоких концентрациях метана, которые могут возникать в результате диссоциации донных газогидратов под влиянием притока теплой атлантической воды, проникающей в Карское море вдоль желоба Святой Анны.

Ключевые слова: погонофоры, метан, газогидраты, желоб Святой Анны, Карское море, потепление Арктики, Siboglinidae

DOI: 10.31857/S2686738922600662, EDN: MOJGOG

Погонофоры — морские кольчатые черви семейства Siboglinidae, которые характеризуются полной редукцией пищеварительного тракта. Жизнедеятельность погонофор полностью обеспечивается за счет симбиотических хемоавтотрофных бактерий, окисляющих сероводород и метан [1–3]. Это позволяет рассматривать сибоглинид в качестве организмов-индикаторов подводных месторождений нефти и газа [4, 5].

Моря российского сектора Арктики рассматриваются как регион с колоссальными запасами нефти, газа и газогидратов [6–10]. При этом Карское море превосходит все другие моря российской Арктики по ресурсам углеводородов [11, 12]. Фауна погонофор Карского моря до последнего времени оставалась практически неизученной. Лишь в 2020 г. два вида погонофор были найдены в Енисейском заливе Карского моря, причем оба оказались новыми для науки [13–15].

В ходе гидробиологических работ в 86-м рейсе научно-исследовательского судна “Академик Мстислав Келдыш” погонофоры были обнаружены в южной части желоба Святой Анны на двух станциях (рис. 1).

Координаты станций и дата сбора приведены в табл. 1.

Отбор проб донных осадков осуществляли с помощью дночерпателя “Океан” с площадью раскрытия 0.25 кв. м. После поднятия дночерпателя на палубу пробы осадков промывали через сито с размером ячеек 0.15 мм. Разбор проб осуществляли с применением бинокулярных микроскопов Микмед (Россия), Olympus SZX (Япония). Фотографирование организмов произведено с помощью окулярной насадки LabCam (iDuOptics, США) для Iphone6S (Apple, США). Для дальнейшего изучения материал был зафиксирован в 96%-ном этаноле.

На станции 7249 на глубине 539 м было обнаружено 3 трубки, в двух из которых были обнаружены живые черви. На станции 7250 на глубине 437 м было обнаружено две трубки без червей. Найденные организмы принадлежат к двум видам подсемейства Frenulata. Ниже дается краткое описание найденных экземпляров. Детальное морфологическое описание, результаты молекулярно-генетического анализа и определение ви-

Таблица 1. Станции, на которых были обнаружены погонофоры

Номер станции	Северная широта, °	Восточная долгота, °	Глубина, м	Дата сбора
7249	77.0001	70.0021	539	22.10.2021
7250	77.4999	68.9953	437	22.10.2021

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

² Институт океанологии им. П.П. Ширшова Российской академии наук, 117997 Москва, Россия

³ Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева Дальневосточного отделения Российской академии наук, 690041 Владивосток, Россия

⁴ Центр морских исследований МГУ, Москва, Россия

*e-mail: mgantsevich@gmail.com

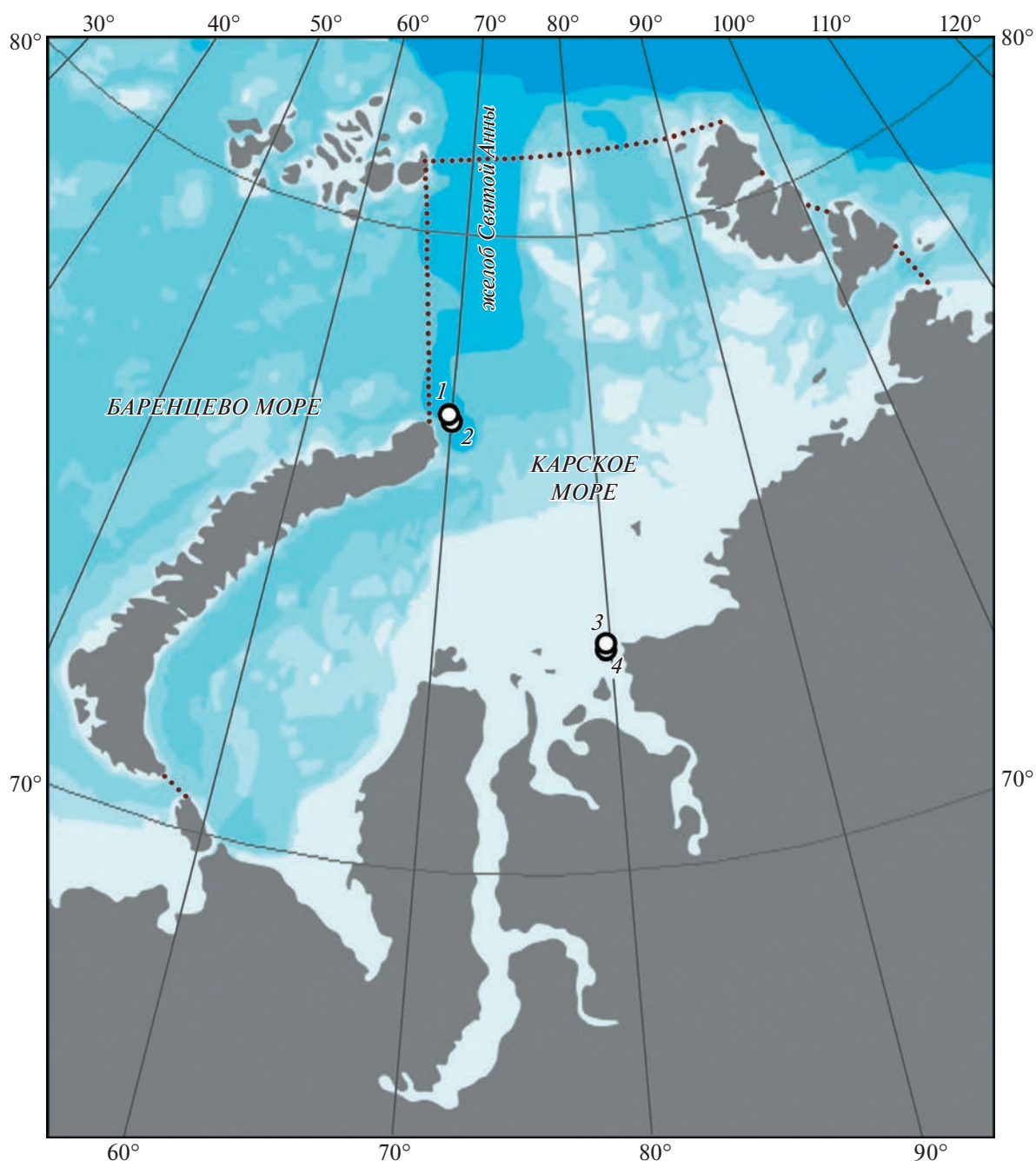


Рис. 1. Находки погонофор в Карском море. 1, 2 — находки в желобе Святой Анны; 3, 4 — находки в Енисейском заливе. Пунктиром показаны географические границы Карского моря.

довой принадлежности будут даны в отдельной публикации.

Frenulata gen. sp. 1 — это единственный экземпляр, найденный в пробе, взятой на станции 7249. Трубка длиной 18 см и диаметром около 0.2 мм полупрозрачная, белесо-желтого цвета, лишена кольчатости по всей длине (рис. 2, *tu*). Фрагмент червя длиной 6 см. Головная лопасть коническая (рис. 2, *cl*). Имеется единственное щупальце

(рис. 2, *te*). Позади уздечки отчетливо видна белая железистая полоса (рис. 2, *gp*). Передняя часть метасомы несет два ряда дорсальных папилл (рис. 2, *pa*). По особенностям морфологии найденный экземпляр близок к роду *Siboglinum*, однако отличается строением трубки, полностью лишенной кольчатости.

Frenulata gen. sp. 2. — две трубки в пробе, взятой на станции 7249, и две трубки в пробе, взятой на

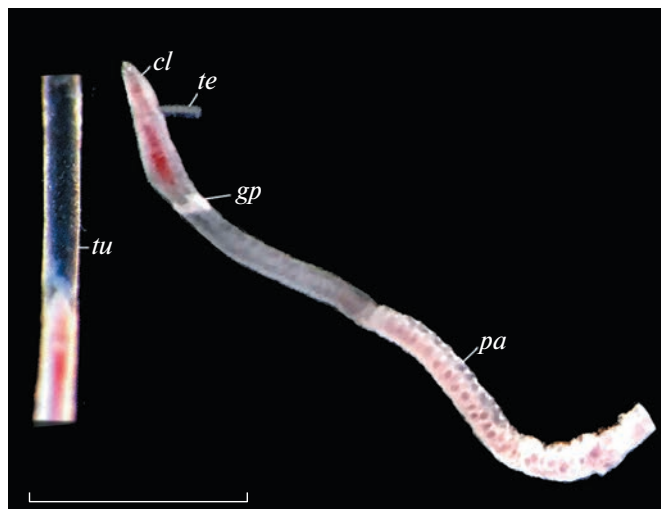


Рис. 2. *Frenulata* gen. sp. № 1. Обозначения: cl — головная лопасть, gp — железистые пятна, pa — папиллы, te — щупальце, tu — трубка. Масштаб 1 мм.

станции 7250. Трубки длиной до 17 см, диаметром 0.15–0.2 мм. Трубки с явственной кольчатостью (рис. 3, *tu*). В одной из трубок из пробы, взятой на станции 7249, обнаружен фрагмент червя длиной 5 см. Головная лопасть короткая, остро-коническая (рис. 3, *cl*). Имеется два щупальца (рис. 3, *te*). Уздечка явственная, ниже уздечки на дорсальной стороне имеются железистые пятна (рис. 3, *br*, *gp*). На спинной стороне метасомы проходит два ряда папилл (рис. 3, *pa*). В трубке обнаружены две личинки. По особенностям морфологии найденный экземпляр похож на представителей рода *Nereillium*, хотя у последнего нет двух рядов дорсальных папилл на метасоме (вместо этого имеются ряды многоклеточных желез).

Погонофоры обнаружены пока только в двух районах Карского моря. Один из них — это район Енисейского залива между о. Сибирякова и западным берегом полуострова Таймыр (рис. 1). *Crispabrachia yenisey* обнаружена на глубине 28 м [13, 15], тогда как *Galathealinum karaense* — на глубине 25 м [14]. Место находки двух видов погонофор в Енисейском заливе находится в районе с высокими концентрациями метана, который продуцируется в процессе деградации вечной мерзлоты под влиянием речного стока [16].

Потепление климата Арктики приводит к диссоциации газогидратов не только в прибрежной зоне, но также в глубоководных впадинах [17, 8, 18]. Как показывают гидрологические исследования, теплая и соленая атлантическая вода поступает через пролив Фрама в центральную впадину Северного Ледовитого океана и, далее, вдоль желоба Святой Анны проникает в Карское море [19, 20]. Существующие модели показывают, что проникновение теплой воды в желоб Святой Анны вызывает значительную диссоциацию донных газогид-

ратов [18]. Образующийся при этом поток метана служит источником, обеспечивающим жизнедеятельность погонофор.

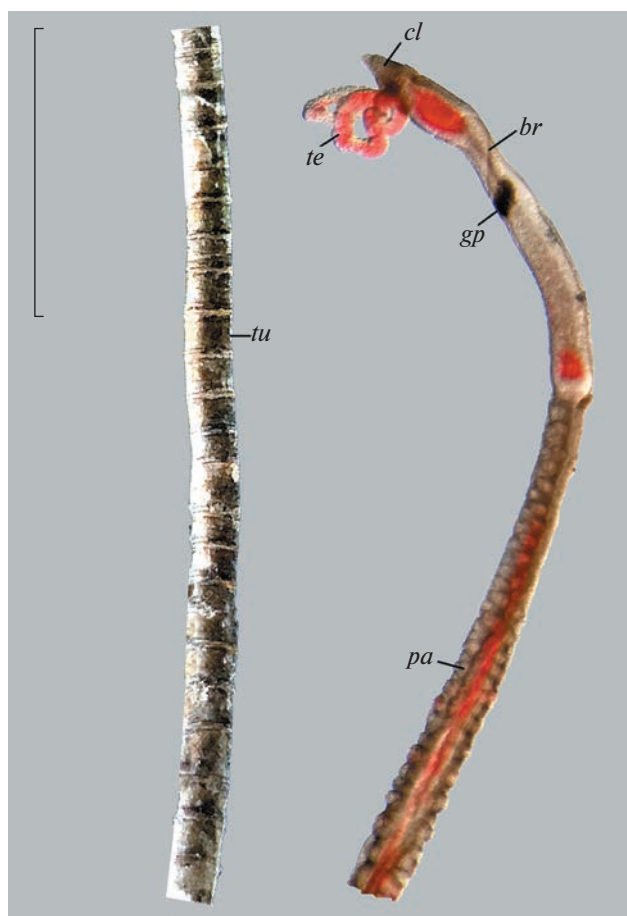


Рис. 3. *Frenulata* gen. sp. № 2. Обозначения: br — уздечка, остальные обозначения как на рис. 2. Масштаб 1 мм.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 18-14-00141-П.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, проводимые в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения или принятой практике для таких исследований.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Информированное согласие было получено от всех участников исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schmaljohann R., Flügel H.J.* Methane-oxidizing bacteria in Pogonophora // *Sarsia*. 1987. V. 72. P. 91–98.
2. *Naganuma T., Elsaied H.E., Hoshii D., Kimura H.* Bacterial endosymbioses of gutless tube-dwelling worms in non hydrothermal vent habitats // *Marine Biotechnology*. 2005. V. 7. P. 416–428.
3. *Lösekann T., Robador A., Niemann H., Knittel K., Boettius A., Dubilier N.* Endosymbioses between bacteria and deep-sea siboglinid tubeworms from an Arctic cold seep (Haakon Mosby mud volcano, Barents Sea) // *Environmental Microbiology*. 2008. V. 10. P. 3237–3254.
4. *Карасева Н.П., Ганцевич М.М., Обжиров А.И., Шакиров Р.Б., Старовойтов А.В., Смирнов Р.В., Малахов В.В.* Сибоглиниды (Annelida, Siboglinidae) как возможные индикаторы углеводородов на примере Охотского моря // *ДАН*. 2019. Т. 486. № 1. С. 127–130.
5. *Karaseva N., Gantsevich M., Obzhirov A., Shakirov R., Starovoitov A., Smirnov R., Malakhov V.* Correlation of the siboglinid (Annelida: Siboglinidae) distribution to higher concentrations of hydrocarbons in the Sea of Okhotsk // *Marine Pollution Bulletin*. 2020. V. 158. 111448.
6. *Gautier D.L., Bird K.J., Charpentier R.R., Grantz A., Houseknecht D.W., Klett T.R., Moore T.E., Pitman J.K., Schenk C.J., Schuenemeyer J.H., Sørensen K., Tennyson M.E., Valin Z.C., Wandrey C.J.* Assessment of Undiscovered Oil and Gas in the Arctic // *Science*. 2009. V. 324. P. 1175–1179.
7. *Spencer A.M., Embry A.F., Gautier D.L., Stoupakova A.V., Sørensen K.* Chapter 1. An overview of the petroleum geology of the Arctic // *Geological Society, London, Memoirs*. 2011. V. 35. P. 1–15.
8. *Max M.D., Johnson A.H., Dillon W.P.* Natural Gas Hydrate – Arctic Ocean Deepwater Resource Potential. *SpringerBriefs in Energy*. 2013. P. 1–113.
9. *Дмитриевский А.Н., Еремин Н.А., Шабалин Н.А., Кондратюк А.Т., Еремин А.Н.* Состояние и перспективы традиционного и интеллектуального освоения углеводородных ресурсов Арктического шельфа // *NefteGas.RU Offshore*. 2017. № 1. С. 32–42.
10. *Dmitrieva D., Romasheva N.* Sustainable Development of Oil and Gas Potential of the Arctic and Its Shelf Zone: The Role of Innovations // *Journal of Marine Science and Engineering*. 2020. V. 1003.
11. *Ананьев В.* До арктического шельфа у России “руки не доходят” // *Oil & Gas Journal*. 2010. Май. С. 38.
12. *Каминский В.Д., Черных А.А., Медведева Т.Ю., Сунруненко О.И., Суворова Е.Б.* Карское море – перспективный полигон для изучения и освоения углеводородных ресурсов // *NefteGaz.RU. Offshore*. 2020. № 5 (101). С. 82–89.
13. *Римская-Корсакова Н.Н., Карасева Н.П., Кокарев В.Н., Симаков М.И., Ганцевич М.М., Малахов В.В.* Первая находка погонофор (Annelida, Siboglinidae) в Карском море совпадает с районом высокой концентрации метана // *ДАН*. 2020. Т. 490. С. 101–104.
14. *Smirnov R.V., Zaitseva O.V., Vedenin A.A.* A remarkable pogonophoran from a desalted shallow near the mouth of the Yenisey River in the Kara Sea, with the description of a new species of the genus *Galathealium* (Annelida: Pogonophora: Frenulata) // *Zoosystematica Rossica*. 2020. V. 29. P. 138–154.
15. *Karaseva N.P., Rimskaya-Korsakova N.N., Ekimova I.A., Gantsevich M.M., Kokarev V.N., Kremnyov S.V., Simakov M.I., Udalov A.A., Vedenin A.A., Malakhov V.V.* A new genus of frenulates (Annelida: Siboglinidae) from shallow waters of the Yenisey River estuary, Kara Sea // *Invertebrate Systematics*. 2021. V. 35. P. 857–875.
16. *Шахова Н.Е., Семилетов И.П., Бельчева Н.Н.* Великие сибирские реки как источники метана на арктическом шельфе // *ДАН*. 2007. Т. 414. № 5. С. 683–685.
17. *Reagan M.T., Moridis G.J., Elliott S.M., Maltrud M.* Contribution of oceanic gas hydrate dissociation to the formation of Arctic Ocean methane plumes // *Journal of Geophysical Research*. 2011. V. 116. C09014.
18. *Giustiniani M., Tinivella U., Jakobsson M., Rebesco M.* Arctic Ocean Gas Hydrate Stability in a Changing Climate // *Journal of Geological Research*. 2013. Article ID 783969, 10 pages.
19. *Dmitrenko I.A., Rudels B., Kirillov S.A., Aksenov Y.O., Lien V.S., Ivanov V.V., Schauer U., Polyakov I.V., Coward A., Barber D.G.* Atlantic water flow into the Arctic Ocean through the St. Anna Trough in the northern Kara Sea // *Journal of Geophysical Research: Oceans*. 2015. V. 120. P. 5158–5178.
20. *Osadchiev A., Viting K., Frey D., Demeshko D., Dzhamalova A., Nurlibaeva A., Gordey A., Krechik V., Spivak E., Semiletov I., Stepanova N.* Structure and Circulation of Atlantic Water Masses in the St. Anna Trough in the Kara Sea // *Frontiers in Marine Sciences*. 2022. V. 9: 915674.

THE DISCOVERY OF POGONOPHORES (ANNELIDA, SIBOGLINIDAE) IN THE ST. ANNA TROUGH (KARA SEA) IN THE AREA OF GAS HYDRATES DISSOCIATION

**N. N. Rimskaya-Korsakova^a, N. P. Karaseva^a, A. A. Osadchiev^b,
Corresponding Member of the RAS I. P. Semiletov^c, M. M. Gantsevich^{a, #},
D. A. Yurikova^{a, d}, and Academician of the RAS V. V. Malakhov^a**

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

^b *Shirshov Institute of Oceanology RAS, Moscow, Russian Federation*

^c *V.I. Ilyichev Pacific Oceanological Institute Far East Branch of the RAS, Vladivostok, Russian Federation*

^d *Marine Research Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

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

Representatives of pogonophores (Annelida, Siboglinidae), whose vital activity is provided by symbiotic chemoautotrophic bacteria that oxidize methane and hydrogen sulfide, were found in the St. Anna trough at depths of 539 m and 437 m. The discovery of pogonophores indicates high concentrations of methane, which can occur because of dissociation of bottom gas hydrates under the influence of the influx of warm Atlantic water penetrating into the Kara Sea along the St. Anna trough.

Keywords: pogonophores, methane, gas hydrates, St. Anna trough, Kara Sea, Arctic warming, Siboglinidae

УДК 576.32/.36 576.893.17

НОВЫЕ ВИДЫ РАСТЕНИЙ, ПРОЯВЛЯЮЩИЕ АНТИПРОТОЗОЙНУЮ АКТИВНОСТЬ

© 2023 г. Е. Г. Черемных¹, А. В. Осипов², В. Г. Старков², Ч. Т. Т. Нгуен (Nguyen Thi Thuy Trang)³,
Х. К. Нгуен (Nguyen Cuu Khoa)⁴, А. Н. Хоанг (Hoang Ngoc Anh)⁴,
З. Т. Ле (Le Tien Dung)⁴, член-корреспондент РАН В. И. Цетлин², Ю. Н. Уткин^{2,*}

Поступило 20.09.2022 г.
После доработки 24.10.2022 г.
Принято к публикации 24.10.2022 г.

Исследовано влияние экстрактов десяти видов растений, произрастающих на территории России, и пяти видов, произрастающих во Вьетнаме, на рост и выживаемость инфузорий *Tetrahymena pyriformis* из подцарства Protozoa, включающего также возбудителей протозойных инфекций. Экстракцию из высушенных растений проводили кислым и щелочным водными растворами, а также водно-этанольным раствором. К клеткам добавляли различные количества экстрактов и регистрировали число выживших клеток через 1 и 24 ч. Мы обнаружили, что наши образцы некоторых растений, включая полынь, гармалу и солодку, подобно исследованным ранее, обладают антипротозойной активностью, что может свидетельствовать об одинаковости вторичных метаболитов у растений из различных регионов. Используя инфузорию *T. pyriformis* в качестве модельного организма, впервые показано наличие антипротозойной активности у экстрактов сирени, хондриллы, сабельника, хмеля и вяза.

Ключевые слова: антипротозойная активность, крапива, хондрилла, сирень, полынь, солодка, вяз, сабельник, хмель, *Tetrahymena pyriformis*

DOI: 10.31857/S2686738922600650, EDN: MOCGXJ

ВВЕДЕНИЕ

Растения — хорошо известный источник различных лекарственных средств, включая целый ряд антимикробных препаратов, в том числе соединений для лечения протозойных инфекций, вызываемых организмами из подцарства простейших (Protozoa), например, артемизинин и хинин, применяемые для лечения малярии, вызываемой паразитическими простейшими рода *Plasmodium*. Сложность лечения таких инфекций связана с тем, что простейшие — эукариоты и многие биохимические процессы у них близки к

таковым у позвоночных. Для лечения протозойных инфекций существует ряд препаратов, в том числе и из растений, например, упомянутые выше хинин и артемизинин из полыни однолетней (*Artemisia annua*) [1]. Главным недостатком существующих препаратов является возникновение к ним устойчивости паразитов [2]. Это диктует задачу поиска новых соединений, и растения, по-прежнему, остаются их перспективным источником. К настоящему времени, (см., например, недавние публикации [3–5]) в растениях различных видов идентифицированы соединения, обладающие антипротозойной активностью. Ранее были указания на наличие антипротозойной активности у некоторых растений, произрастающих во Вьетнаме (например, [6]). Однако существуют лишь весьма ограниченные данные (например, [7]) об антипротозойной активности растений, произрастающих в России.

Учитывая все вышеизложенное, целью данной работы явилось исследование антипротозойной активности ранее не изученных видов растений, произрастающих на территории Вьетнама и России. Для проведения оценки антипротозойной активности экстрактов растений в данной работе использовали инфузорию *T. pyriformis* в качестве

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение Научный центр психического здоровья (НЦПЗ), Москва, Россия

² ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

³ Университет им. Нгуен Тат Тхань, Хо Ши Мин, Вьетнам

⁴ Институт Наук о Прикладных Материалах Вьетнамской Академии Наук и Технологий, Хо Ши Мин, Вьетнам

*e-mail: utkin@ibch.ru

модельного организма, а влияние экстрактов на жизнеспособность инфузорий определяли с помощью автоматизированного приборного комплекса БиоЛат-3.2 (Россия).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растения собирали в вегетационный период, промывали и сушили в естественных условиях в прохладном месте с вентилятором или в проветриваемом месте. После сушки растения измельчали в порошок и хранили в прохладном месте.

Всего было изучено десять видов растений, произрастающих на территории России:

Artemisia absinthium (AA, Полынь горькая, Московская область) – трава;

Chondrilla juncea (ChJ, Хондрилла ситниковая, Волгоградская область) – трава;

Comarum palustre (CP, Сабельник болотный, Московская область) – стебли;

Humulus lupulus (HL, Хмель обыкновенный, Саратовская область) – цветы;

Glycyrrhiza glabra (GG, Солодка гладкая, Волгоградская область) – корень;

Péganum harmala (PH, Гармала обыкновенная, или могильник обыкновенный, Волгоградская область) – стебли и листья; плоды и семена;

Syringa vulgaris (SV, Сирень обыкновенная, Тульская область) – соцветия;

Ulmus laevis (UL, Вяз гладкий, Московская область) – кора;

Urtica dioica (UD, Крапива двудомная, Московская область) – семена;

Vitex agnus-castus (VA, Витекс священный, арамово дерево, Краснодарский край) – семена.

Растения высушивали и хранили при комнатной температуре. Экстракты российских растений готовили с использованием трех способов экстракции: щелочного с использованием 20 мМ гидрокарбоната натрия (NaHCO_3), кислотного – 3% уксусной кислоты (CH_3COOH) и спиртового – 96% этанола ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$). Экстракцию в среднем 1 г высушенного сырья проводили в затемненном месте 24 ч при комнатной температуре при покачивании и соотношении сырья и экстрагента 1:25 w/v. Экстракт фильтровали и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 3 мин. Щелочные и кислотные экстракты лиофилизировали, растворяли в 2.5 мл воды и повторно лиофилизировали. Спиртовую вытяжку упаривали на ротационном испарителе, затем растворяли в 2.5 мл смеси спирт/вода 2:1 и лиофилизировали. Для измерения активности щелочные и кислотные экстракты растворяли в 1 мл дистиллированной воды, спиртовые – в 1 мл 70% этанола, центрифугировали и проводили измерения при различных разведениях.

Было проведено исследование пяти растений, произрастающих во Вьетнаме:

Artemisia vulgaris (AV, полынь обыкновенная, провинция Киен Занг (Kiên Giang) – трава;

Hedyotis diffusa (HD, олденландия диффузная, провинция Бинь Фьюк (Bình Phước) – все растение;

Scoparia dulcis (SD, скопария сладкая, провинция Винь Лонг (Vinh Long) – листья;

Scutellaria barbata (SB, шлемник бородачатый, провинция Тхань Хоа (Thanh Hoa) – все растение;

Tiliacora triandra (TT, тилиакора трехтычинковая, провинция Кан Тхо (Cần Thơ) – все растение.

Экстракцию проводили согласно методике [8], используя в качестве экстрагента 30 или 96% этанол ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) при комнатной температуре. Растворитель выпаривали при низком давлении и полученный экстракт использовали для дальнейших исследований.

Для определения антипротозойной активности препараты подготавливали следующим образом. Взвешивали по 0.5 г массы спиртового экстракта и растворяли в 0.5 мл 30% или 96% раствора этанола (соответственно концентрации этанола, ранее взятого для экстракции). Для образцов AV, SB и SD, экстрагированных 96% этанолом, взять навеску не представлялось возможным из-за их высокой вязкости. Эти образцы весом 5 г растворяли полностью в 5 мл 96% этанола и отбирали по 0.5 мл. После охлаждения до 6° С (в холодильнике), центрифугировали 3 мин при 3000 об/мин и проводили измерение биологической активности.

Для определения антипротозойной активности применяли метод, использованный ранее для анализа подобной активности ядов змей [9]. Вкратце, эта методика включает процедуру подсчета инфузорий *T. pyriformis* с применением приборно-вычислительного комплекса для автоматизированного биотестирования с системой визуализации и программным обеспечением для математической обработки данных БиоЛат-3.2 (ООО “Европолитест”, Московская обл., г. Пушкино). Все эксперименты проводили на инфузориях, которые культивировали по закрытой системе в стерильных условиях. В лунки планшета прибора БиоЛат-3.2 вносили 290 мкл проб, представляющих собой соответствующие водные разведения (табл. 1 и 2) экстрактов растений. При исследовании спиртовых экстрактов в качестве контроля использовали 1% спирт, в котором в течение 1 ч выживают 100% инфузорий, а прирост за 24 ч составляет около 200%. После программной оценки лунок с пробами без инфузорий в них вносили суспензию инфузорий, содержащую

500–1000 клеток. Конечный объем пробы 300 мкл. Каждое измерение повторяли в 3 лунках. Далее производили десятикратный программный подсчет клеток и фиксировали результаты. Планшет помещали в термостат и через 24 ч повторно с использованием программы подсчитывали инфузорий во всех заданных лунках. Для количественной оценки активности рассчитывали коэффициенты выживаемости/роста (K)

$$K = T_{24}/T_0,$$

где T_{24} — количество живых инфузорий в пробе после 24-часовой экспозиции; T_0 — количество живых инфузорий в начале опыта. Коэффициенты роста/выживаемости по каждому разведению вычисляли как среднее по трем коэффициентам для лунок с одинаковыми пробами. В контрольных опытах при 24-часовой экспозиции инфузорий в дистиллированной воде этот коэффициент составил: $2.5 \geq K \geq 2$. Кроме того, для определения чувствительности простейших нами использовался раствор CuSO_4 (0.1 мкМ), который вызывал гибель всех клеток в течение одного часа. Для определения зависимости гибели клеток от времени инкубации проводили регистрацию выживших инфузорий в течение часа. В краткосрочном эксперименте использовали от 2000 до 4000 клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании активности уксусных, содовых и спиртовых экстрактов растений при экспозиции 24 ч оказалось, что содовый экстракт гармалы (РН) обладал токсичностью по отношению к инфузории *T. pyriformis*. Меньшую активность показал кислотный экстракт, в то время как спиртовой экстракт был не активен при исследованных концентрациях (табл. 1). Токсичность также проявили уксусный экстракт полыни горькой (АА) (табл. 1) и спиртовые экстракты полыни обыкновенной (АВ) (табл. 2). Поскольку экстракты российских и вьетнамских растений получены разными способами, данные об их активности приведены в разных таблицах. У солодки (GG) весьма активными оказались уксусный и спиртовой экстракты (табл. 1). Довольно высокая активность обнаружена у спиртовых экстрактов скопарии (SD) (табл. 2) и витекса священного (ВА) (табл. 1). Приведенные данные свидетельствуют о том, что полынь (АА, АВ), солодка (GG), скопария (SD) и витекс (ВА), вне зависимости от того, в каком регионе осуществлялся сбор растений, обладают антипротозойной активностью. Вместе с тем в 24-часовом эксперименте токсичность по отношению к *T. pyriformis* проявили уксусный экстракт сабельника болотного (СР) и спиртовой экстракт сирени обыкновенной (SV) (табл. 1). Слабую активность против инфузорий показали

уксусные экстракты крапивы (UD), хондриллы (ChJ) и сирени (SV) (табл. 1). В той или иной мере антипротозойную активность продемонстрировали практически все спиртовые экстракты Вьетнамских растений (табл. 2). При этом токсический эффект обнаруживался как в долговременном (24 ч, табл. 2), так и в кратковременном эксперименте (в качестве примера на рис. 1 показан эффект, развивающийся под действием разных концентраций спиртового экстракта тилиа-коры (ТТ) в течение 1 ч). В экспериментах по влиянию на рост клеток (24 ч) мы не обнаружили токсичности для инфузорий экстрактов цветов хмеля (НЛ) и коры вяза (UL) (табл. 1). Интересно, что в краткосрочных экспериментах выживаемость инфузорий подавляли уксусный и спиртовой экстракты хмеля (НЛ), а также уксусные экстракты вяза (UL), полыни (АА), сабельника (СР) и солодки (GG) (данные не приведены). Таким образом, впервые показано наличие антипротозойной активности у нескольких видов растений, включая, в частности, сирень (SV) и хондриллу (ChJ).

При выборе растений для исследования мы руководствовались следующими положениями. Для некоторых видов растений, произрастающих в других регионах, ранее было показано наличие антипротозойной активности и проведены ее детальные исследования. Это касается прежде всего полыней (АА и АВ) [10–13], гармалы (РН) [14, 15] и солодки (GG) [16]. В рамках данной работы планировалось установить, обладают ли эти растения, произрастающие в других географических регионах, в частности в России и Вьетнаме, антипротозойной активностью.

Для ряда растений имелись лишь предварительные данные о наличии антипротозойной активности без ее детального исследования. Такие данные имелись для скопарии (SD) [8], крапивы (UD) [17] и витекса священного (ВА) [18]. Выбор других растений обоснован тем, что либо имеются публикации об их токсичности для других микроорганизмов, а не простейших (например, [19]), либо есть упоминания в рецептах народной медицины об их антимикробной активности [20].

В нашей работе исследованы экстракты 15 видов растений. Полученные нами данные, в общем, согласуются с литературными данными. Для ряда исследованных нами растений ранее было показано наличие антипротозойной активности. Это касается, в частности, полыни (АА, АВ), гармалы (РН) и солодки (GG). Однако известно, что растения, произрастающие в разных регионах, могут содержать различные вторичные метаболиты и, соответственно, их экстракты могут обладать различной биологической активностью. Такие различия показаны ранее, в частности, для полыни альпийской *Artemisia umbelliformis* [21].

Таблица 1. Коэффициенты выживаемости/роста¹ количества клеток в растворах экстрактов растений при экспозиции 24 ч

Вид растения	Укусный экстракт			Содовый экстракт					Спиртовой экстракт
	Разведение								
	1.25%	2.50%	5.00%	10.00%	1.25%	2.50%	5.00%	10.00%	
<i>Vitex agnus-castus</i> (VA), семена	5.4 ± 0.08 ²	5.3 ± 0.076	4.6 ± 0.027	3.2 ± 0.05	2.6 ± 0.02	2.5 ± 0.088	4.3 ± 0.11	4.8 ± 0.88	0
<i>Urtica dioica</i> (UD), трава	3.3 ± 0.06	2.6 ± 0.033	1.6 ± 0.02	0	3 ± 0.06	2.1 ± 0.05	1.6 ± 0.05	1.9 ± 0.05	11.66 ± 0.72
<i>Chondrilla juncea</i> (ChJ), трава	4 ± 0.047	4.3 ± 0.05	0.18 ± 0.013	0	6.4 ± 0.3	5.4 ± 0.07	3.9 ± 0.048	3.2 ± 0.048	2.04 ± 0.056
<i>Syringa vulgaris</i> (SV), соцветия	3.2 ± 0.076	2.6 ± 0.05	1.6 ± 0.02	0	2.9 ± 0.12	4.5 ± 0.09	4.1 ± 0.056	8.3 ± 0.056	0
	1.0%				1.0%				0.05%
<i>Artemisia absinthium</i> (AA), трава	0	— ³	—	—	2.03 ± 0.02	—	—	—	1.67 ± 0.04
<i>Péganium harmala</i> (PH), цветы	—	1.01 ± 0.041	—	—	—	0 (2%)	—	—	4.88 ± 0.098 (1.6%)
<i>Comarum palustre</i> (CP), стебли	0	—	—	—	2.21 ± 0.062	—	—	—	1.88 ± 0.08
<i>Glycerrhiza glabra</i> (GG), корень	0	—	—	—	1.16 ± 0.028	—	—	—	0
<i>Humulus lupulus</i> (HL), цветы	2.01 ± 0.028	x ⁴	x	x	2.11 ± 0.061	x	x	x	1.79 ± 0.027
<i>Ulmus laevis</i> (UL), кора	1.72 ± 0.018	x	x	x	2.2 ± 0.088	x	x	x	1.76 ± 0.034

¹ Коэффициент выживаемости – отношение числа живых инфузорий в растворах экстрактов к числу живых инфузорий в контроле.

² Среднее по трем измерениям ± коэффициент вариации.

³ Дефис означает, что при данной концентрации анализ не проводился.

⁴ x означает, что вследствие высокой интенсивности окрашивания проб невозможно зафиксировать результатов эксперимента с помощью используемого метода.

Таблица 2. Коэффициенты выживаемости/роста количества клеток в растворах экстрактов растений при экспозиции 24 ч

Вид растения	Разведение, %	Концентрация этанола	
		30%	96%
<i>Artemisia vulgaris</i> (AV), трава	0.125	2.16 ± 0.049 ¹	2.45 ± 0.031
	0.25	1.42 ± 0.031	1.04 ± 0.054
	0.5	0.98 ± 0.022	0.00
	1	0.00	0.00
<i>Hedyotis diffusa</i> (HD)	0.125	2.80 ± 0.927	1.65 ± 0.052
	0.25	1.71 ± 0.02	0.00
	0.5	1.37 ± 0.025	0.00
	1	0.00	0.00
<i>Scutellaria barbata</i> (SB)	0.0625	1.46 ± 0.014	2.75 ± 0.045
	0.125	1.57 ± 0.055	3.03 ± 0.027
	0.25	1.30 ± 0.08	1.96 ± 0.039
	0.5	0.00	0.00
<i>Scoparia dulcis</i> (SD), листья	0.0625	2.92 ± 0.01	3.74 ± 0.033
	0.125	2.74 ± 0.078	3.04 ± 0.039
	0.25	0.00	0.00
	0.5	0.00	0.00
<i>Tiliacora triandra</i> (TT)	0.0625	2.61 ± 0.015	1.71 ± 0.039
	0.125	1.90 ± 0.047	1.57 ± 0.033
	0.25	1.90 ± 0.11	1.33 ± 0.034
	0.5	2.17 ± 0.066	0.00
	1	1.70 ± 0.037	0.00

¹ Среднее по трем измерениям ± коэффициент вариации.

Тем не менее исследованные нами образцы полыни, гармалы и солодки проявили антипротозойную активность, как это было показано для этих видов растений, собранных в других регио-

нах [10–16]. Интересно, что у гармалы (РН) антипротозойная активность обусловлена такими алкалоидами, как гармин и пеганин. Алкалоиды, основные по своей природе, обычно экстрагиру-

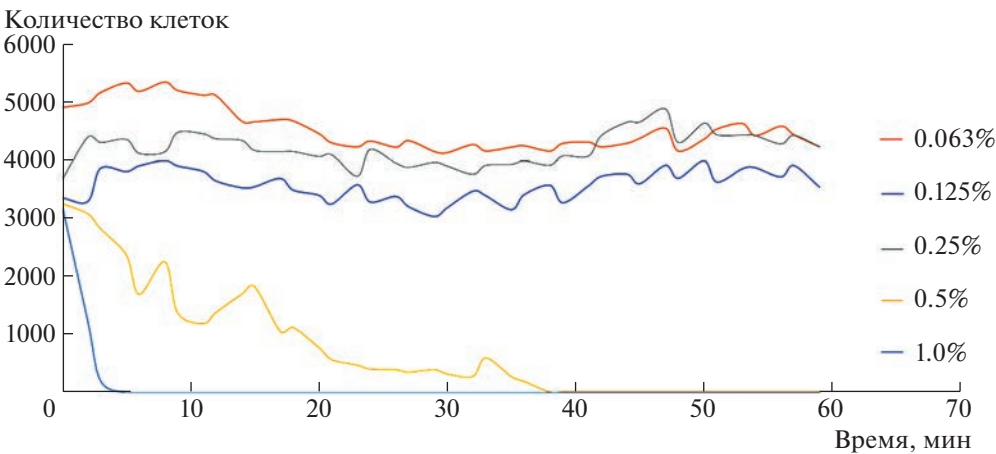


Рис. 1. Изменение количества живых клеток *T. pyriformis* в зависимости от времени действия различных концентраций спиртового экстракта *Tiliacora triandra*. 0.063–1.0% – разведения исходного спиртового раствора.

ются кислыми растворителями, и в нашем случае именно уксусный экстракт проявил токсичность по отношению к инфузориям (табл. 1), как и в работе [14] — против лейшманий. Однако наряду с этим такую же активность проявил щелочной экстракт гармалы (табл. 1), что может свидетельствовать о наличии в гармале антипротозойных соединений иной природы. В нашем исследовании токсичность проявили кислотные экстракты крапивы (UD), сирени (SV) и хондрилы (ChJ) (табл. 1). Поэтому можно предположить наличие в этих растениях алкалоидов основной природы, также обладающих антипротозойной активностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследовав влияние экстрактов десяти видов растений, произрастающих на территории России, и пяти видов, произрастающих во Вьетнаме, на рост и выживаемость инфузорий *T. pyriformis*, было обнаружено, что наши образцы некоторых растений, включая полынь, гармалу и солодку, подобно исследованным ранее, обладают антипротозойной активностью, что может свидетельствовать об общности вторичных метаболитов у растений из различных регионов. Впервые на примере инфузории *T. pyriformis* показано наличие антипротозойной активности у экстрактов сирени, сабельника, хмеля и вяза. Полученная информация позволяет сделать выбор перспективных растений для дальнейшей работы, в частности, это хондрила и сирень. В настоящее время в этих растениях проводится идентификация соединений, обладающих антипротозойной активностью.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 21-54-54005) и Вьетнамской академии наук и технологий (проект QTRU01.15/21-22).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yang J., He Y., Li Y., et al. Advances in the research on the targets of anti-malaria actions of artemisinin. // Pharmacol. Ther. 2020. V. 216. P. 107697.
2. Ricotta E., Kwan J. Artemisinin-Resistant Malaria as a Global Catastrophic Biological Threat. // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2019. V. 424. P. 33–57.
3. Anibogwu R., Jesus K., Pradhan S., et al. Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Artemisia and Their Biological Significance: A Review. // Molecules. 2021. V. 26. № 22. P. 6995.
4. Anmol, Kumari S., Kumar R., et al. Antiplasmodial diterpenoid alkaloid from *Aconitum heterophyllum* Wall. ex Royle: Isolation, characterization, and UHPLC-DAD based quantification. // J. Ethnopharmacol. 2022. V. 287. P. 114931.
5. Chemed G., Bisrat D., Yeshak M.Y., et al. In Vitro Antileishmanial and Antitrypanosomal Activities of Plitacalloside Isolated from the Leaf Latex of *Aloe rugosifolia* Gilbert & Sebsebe (Asphodelaceae). // Molecules. 2022. V. 27. № 4. P. 1400.
6. Nguyen-Pouplin J., Tran H., Tran H., et al. Antimalarial and cytotoxic activities of ethnopharmacologically selected medicinal plants from South Vietnam. // J. Ethnopharmacol. 2007. V. 109 № 3. P. 417–427.
7. Kikhanova Z.S., Iskakova Z.B., Dzhalmakhanbetova R.I., et al. Constituents of *Artemisia austriaca* and their Biological Activity. // Chem. Nat. Compd. 2013. V. 49. P. 967–968.
8. Tin N.N.T., Truc N.D.T., Hang H.T.T., et al. Chemical Constituents of the Aerial Parts of *Scoparia dulcis* and Anti-Cancer, Anti-Inflammatory Activities. // Key Engineering Materials. 2019. V. 814. P. 360–364.
9. Черемных Е.Г., Осипов А.В., Старков В.Г., и др. Сравнительное исследование влияния ядов змей на рост инфузорий *Tetrahymena pyriformis*: идентификация ядов с высокой антипротозойной активностью. // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2022. Т. 503. С. 197–202.
10. Najm M., Hadighi R., Heidari-Kharaji M., et al. Anti-Leishmanial Activity of *Artemisia persica*, *A. spicigera*, and *A. fragrans* against *Leishmania major*. // Iran. J. Parasitol. 2021. V. 16. № 3. P. 464–473.
11. Loo C.S., Lam N.S., Yu D., et al. Artemisinin and its derivatives in treating protozoan infections beyond malaria. // Pharmacol. Res. 2017. V. 117. P. 192–217.
12. Azizi K., Shahidi-Hakak F., Asgari Q., et al. In vitro efficacy of ethanolic extract of *Artemisia absinthium* (Asteraceae) against *Leishmania major* L. using cell sensitivity and flow cytometry assays. // J. Parasit. Dis. 2016. V. 40. № 3. P. 735–740.
13. Bamunuarachchi G.S., Ratnasooriya W.D., Premakumara S., et al. Antimalarial properties of *Artemisia vulgaris* L. ethanolic leaf extract in a *Plasmodium berghei* murine malaria model. // J. Vector Borne. Dis. 2013. V. 50. № 4. P. 278–284.
14. Rokni N., Faridnia R., Esboei B.R., et al. *Peganum harmala* and *Nigella sativa*: anti-leishmanial activity against *Leishmania major* promastigotes and amastigotes: in vitro and ex vivo experiment. // Ann. Parasitol. 2021. V. 67. № 2. P. 313–319.
15. Boonhok R., Sangkanu S., Chuprom J., et al. *Peganum harmala* Extract Has Antiamoebic Activity to *Acanthamoeba triangularis* Trophozoites and Changes Expression of Autophagy-Related Genes. // Pathogens. 2021. V. 10. № 7. P. 842.
16. Sheikhi S., Khamesipour A., Radjabian T., et al. Immunotherapeutic effects of *Glycyrrhiza glabra* and Glycyrrhizic Acid on *Leishmania major*-infection BALB/C mice. // Parasite Immunol. 2022. V. 44. № 1–2. P. e12879.

17. *Badirzadeh A., Heidari-Kharaji M., Fallah-Omrani V., et al.* Antileishmanial activity of *Urtica dioica* extract against zoonotic cutaneous leishmaniasis. // PLoS Negl. Trop. Dis. 2020. V. 14. № 1. P. e0007843.
18. *Borges A.R., Aires J.R., Higino T.M., et al.* Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. // Exp. Parasitol. 2012. V. 132. № 2. P. 123–128.
19. Стругар Й., Повыдыш М.Н. Химические компоненты *Comarum palustre* L. и их биологическая активность. Медико-фармацевтический журнал “Пульс”. 2020. Т. 22. № 12. С. 126–140.
20. Пастушенков Л.В., Пастушенков А.Л., Пастушенков В.Л. Лекарственные растения. Использование в народной медицине и в быту. Санкт-Петербург: БХВ-Петербург; 2012.
21. *Rubiolo P., Matteodo M., Bicchi C., et al.* Chemical and biomolecular characterization of *Artemisia umbelliformis* Lam., an important ingredient of the alpine liqueur “Genepi”. // J. Agric. Food Chem. 2009. V. 57. № 9. P. 3436–3443.

NEW PLANT SPECIES SHOWING ANTIPROTOZOIAN ACTIVITY

E. G. Cheremnykh^a, A. V. Osipov^b, V. G. Starkov^b, Nguyen Thi Thuy Trang^c, Nguyen Cuu Khoa^d, Hoang Ngoc Anh^d, Le Tien Dung^d, Corresponding Member of the RAS V. I. Tsetlin^b, and Yu. N. Utkin^{b, #}

^a Mental Health Research Centre, Moscow, Russian Federation

^b Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^c Nguyen Tat Thanh University, Ho Chi Minh City, Vietnam

^d Institute of Applied Materials Science, Vietnam Academy of Science and Technology, Ho Chi Minh City, Vietnam

[#]e-mail: utkin@ibch.ru

The effects of extracts of ten plant species growing in Russia and five species growing in Vietnam on the growth and survival of ciliates *Tetrahymena pyriformis* were studied. *T. pyriformis* is from the Protozoa subkingdom, which also includes pathogens of protozoan infections. Extraction of dried plants was carried out with acidic and alkaline aqueous solutions, as well as with an aqueous ethanol solution. Various amounts of extracts were added to the infusoria cells and the number of survived cells was recorded after 1 and 24 hours. We found that our samples of several plants, including wormwood, harmala, and licorice, similarly to those studied earlier, have antiprotozoal activity, which may indicate a sameness of secondary metabolites in plants from different regions. Using the ciliate *T. pyriformis* as a model organism, the presence of antiprotozoal activity in extracts of lilac, chondrilla, cinquefoil, hop and elm was shown for the first time.

Keywords: antiprotozoal activity, nettle, chondrilla, lilac, wormwood, licorice, elm, cinquefoil, hop, *Tetrahymena pyriformis*

УДК 577.218

КО-РЕПРЕССОР NCoR ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С ТРАНСКРИПЦИОННЫМ ФАКТОРОМ KAISO ПО МЕХАНИЗМУ, ОТЛИЧНОМУ ОТ ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С BCL6

© 2023 г. К. И. Балагуров^{1,*}, академик РАН П. Г. Георгиев¹, А. Н. Бончук¹

Поступило 20.09.2022 г.

После доработки 24.10.2022 г.

Принято к публикации 24.10.2022 г.

Транскрипционный фактор позвоночных Kaiso специфично связывается с метилированными последовательностями ДНК при помощи цинковых пальцев C2H2-типа. Помимо C2H2-доменов, на N-конце Kaiso находится ВТВ/POZ домен, который формирует гомодимеры. Kaiso, как и несколько других хорошо исследованных ВТВ/POZ белков, в том числе BCL6, взаимодействует с белком NCoR (nuclear co-repressor), который определяет посадку на хроматин комплексов, репрессирующих транскрипцию. С помощью дрожжевой двугибридной системы мы показали, что N-концевой домен NCoR взаимодействует с С-концевыми цинковыми пальцами Kaiso, а не с его ВТВ/POZ доменом, как предполагалось ранее. Полученные результаты демонстрируют, что NCoR взаимодействует с различными доменами транскрипционных факторов, что может увеличивать эффективность привлечения NCoR-зависимых репрессорных комплексов в регуляторные области генома.

Ключевые слова: ко-репрессоры, белки с цинковыми пальцами, C2H2-домены, факторы транскрипции, репрессия транскрипции

DOI: 10.31857/S2686738922600777, **EDN:** MPYLIL

Kaiso – транскрипционный фактор позвоночных, специфично связывающий метилированные CpG последовательности ДНК при помощи цинковых пальцев C2H2-типа. Помимо C2H2-доменов, на N-конце Kaiso находится димеризующийся ВТВ/POZ домен (ВТВ-домен). Ряд данных свидетельствует, что Kaiso является репрессором транскрипции [1]. В предыдущих работах было показано взаимодействие Kaiso и ко-репрессора NCoR, что объясняет, каким образом данный фактор участвует в репрессии транскрипции [2]. Транскрипционный ко-репрессор NCoR является компонентом мультибелковых репрессорных комплексов, которые включают гистон-деацетилазы (HDAC) классов 1 и 2 и другие вспомогательные белки. NCoR содержит несколько доменов (рис. 2б), которые отвечают за белок-белковые взаимодействия и является ключевым звеном в процессах сборки и привлечения репрессорных комплексов, одновременно взаимодействуя с субъединицами данных комплексов, транскрипционными факторами, а также с гисто-

нами [3, 4]. Кроме того, NCoR непосредственно регулирует активность HDAC3 [5]. Первоначально NCoR был идентифицирован как белок, репрессирующий транскрипцию генов-мишеней рецепторов тиреоидного гормона и ретиноевой кислоты [6]. Нарушения экспрессии NCoR связывают с развитием некоторых онкологических заболеваний, например, глиобластомы [7].

Ряд транскрипционных факторов, включая ВТВ-содержащие белки BCL6, MAZR, PLZF, а также Kaiso, взаимодействуют с NCoR и могут привлекать репрессорные комплексы в область целевых промоторов, иницируя репрессию транскрипции. В связывании с NCoR участвуют ВТВ-домены транскрипционных факторов [2, 8–10]. Кристаллические структуры комплексов ВТВ-домена BCL6 и фрагментов NCoR, а также его ближайшего гомолога SMRT(NCoR2) показали, что во взаимодействии принимает участие пептид-связывающая бороздка ВТВ-домена и консервативная BBD1 полипептидная последовательность в С-концевой части ко-репрессоров [8, 11]. Также у NCoR описана дополнительная С-концевая последовательность BBD2, стабилизирующая взаимодействие с BCL6 [11].

Ранее методом GST pull-down было показано, что полноразмерный белок Kaiso связывается с N-концевым RD1-доменом NCoR, что отличает-

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

*e-mail: kostya.chamomilla@gmail.com

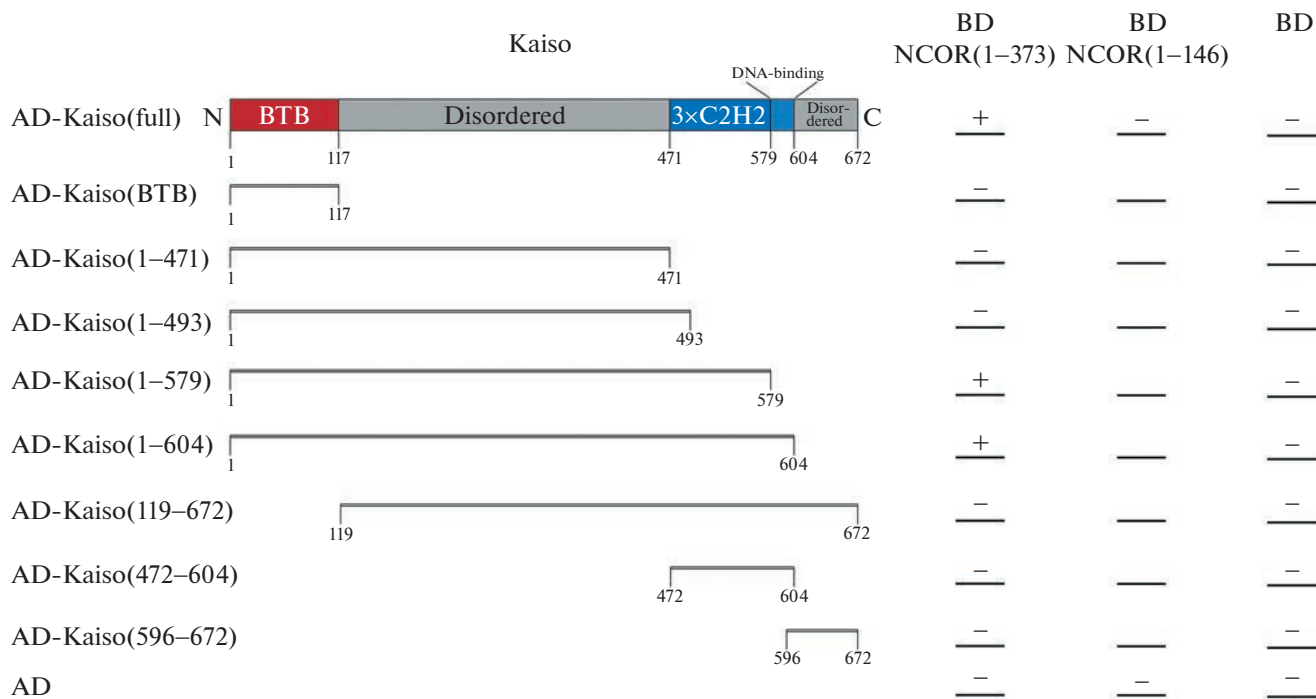


Рис. 1. Исследование способности делеционных мутантов белка Kaiso, слитых с AD Gal4, к взаимодействию с фрагментами белка NCoR, слитых с BD Gal4, в дрожжевой двугибридной системе. AD – активационный домен белка GAL4. BD – ДНК-связывающий домен GAL4. На схеме белков исследованный участок обозначен толстой линией, а ниже указаны номера аминокислот в полипептидной последовательности. В таблице + и – обозначают наличие или отсутствие взаимодействия между соответствующими белками. Пропуски в таблице означают отсутствие экспериментальных данных. В качестве положительного контроля использовалась способность к гомодимеризации N-конца белка Kaiso (1–117 а.к.), содержащего BTB-домен, а в качестве отрицательного контроля – тестирование всех исследуемых белков на наличие взаимодействия только с активационным (AD) или ДНК-связывающим (BD) доменом белка GAL4. C2H2 – домены цинковых пальцев C2H2-типа, BTB - Broad-complex, tramtrack, and bric-a-brac domain.

ся от механизма связывания данного ко-репрессора с BCL6. Также было показано, что BTB-домен Kaiso связывается с полноразмерным NCoR [2]. Методом дрожжевой двугибридной системы (ДДС) нам не удалось подтвердить прямое взаимодействие BTB-домена Kaiso и RD1-домена NCoR. Таким образом, целью настоящего исследования стало картирование доменов, определяющих взаимодействие между белками Kaiso и NCoR.

Для картирования участка взаимодействия на основе опубликованных структурных данных, а также модели AlphaFold2, была проанализирована доменная организация Kaiso, включающая BTB-домен и три ДНК-связывающих цинковых пальца, между которыми расположен длинный неструктурированный участок [12, 13]. За последним цинковым пальцем следует консервативная последовательность, принимающая участие в стабилизации ДНК-белкового комплекса, после которой располагается неструктурированный С-концевой участок. Исходя из доменной организации, был получен ряд делеционных мутантов Kaiso: BTB-домен (1–117 а.о.), белок без BTB-домена (119–672 а.о.), цинковые пальцы

(472–579 а.о.), С-концевой участок (596–672 а.о.), а также несколько вариантов белка с усеченным С-концом (рис. 1). Исследование белок-белковых взаимодействий проводилось методом ДДС. Были получены генетические конструкции для экспрессии делеционных производных Kaiso и NCoR, слитых с активационным (AD) или с ДНК-связывающим (BD) доменом транскрипционного активатора GAL4. Эксперименты с полноразмерным Kaiso, слитым с BD GAL4, ограничиваются его способностью к сильной активации транскрипции в ДДС, что позволяет исследовать его взаимодействия с другими белками только в случае, если он слит с активационным доменом GAL4.

По результатам ДДС было подтверждено прямое взаимодействие между полноразмерным белком Kaiso(full) и RD1-доменом NCoR(1–373). При этом Kaiso не взаимодействует с NCoR(1–146), что говорит о расположении области, связывающейся с Kaiso, между 146 и 373 аминокислотными остатками NCoR. Прямое взаимодействие изолированного BTB-домена Kaiso и NCoR(1–373) подтверждено не было. Также не было выявлено взаимодействие NCoR(1–373) с любым вариантом

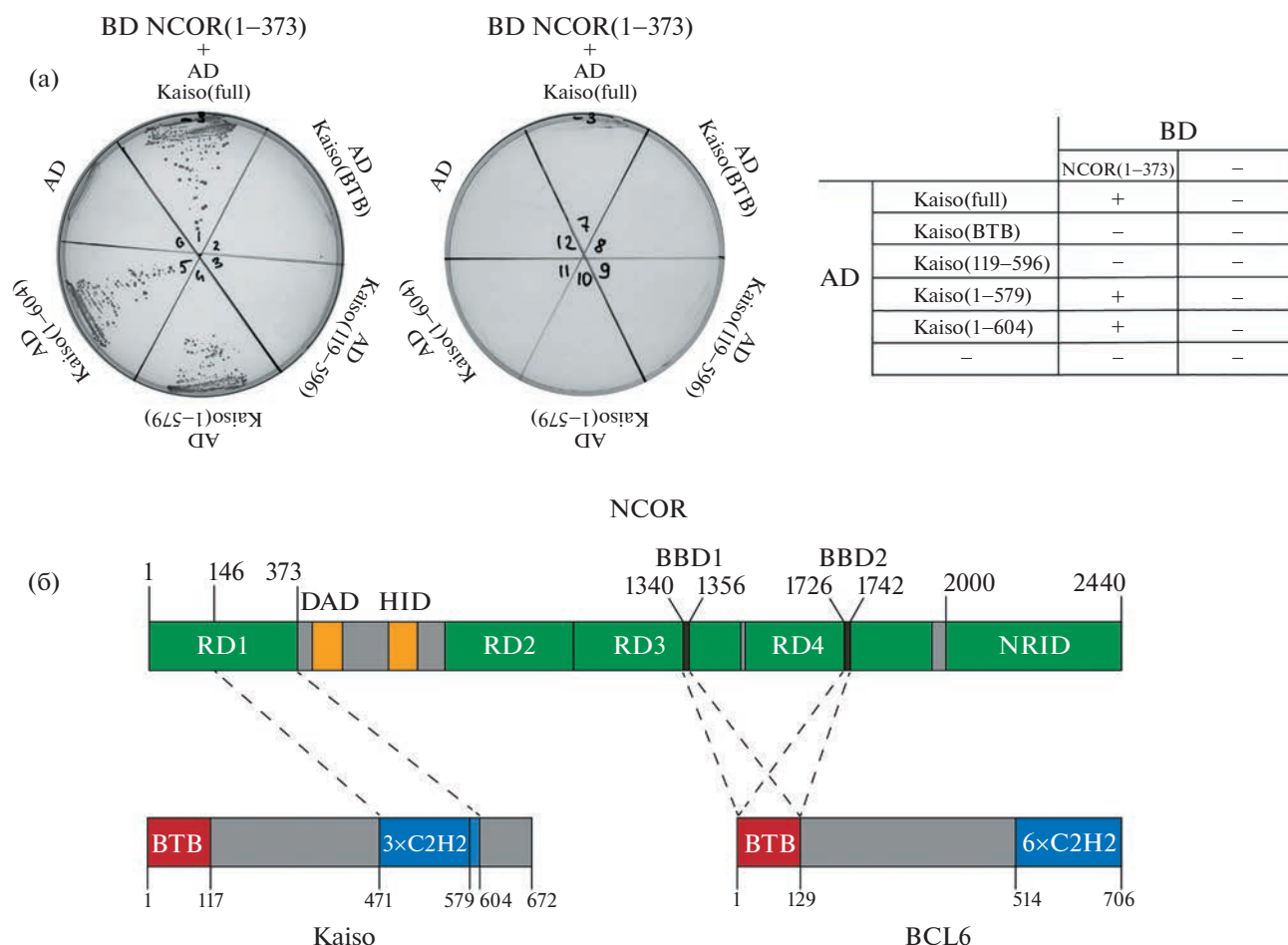


Рис. 2. а – Взаимодействие полноразмерного Kaiso, а также его некоторых делеционных производных в ДДС. Экспериментальные чашки, не содержащие гистидина, показаны слева, итоговая таблица взаимодействий справа. б – Схематичное изображение районов взаимодействия NCoR с белками Kaiso и BCL6. RD – репрессивные домены NCoR, NRID – домены, связывающие ядерные рецепторы, DAD – deacetylase activating domain, HID – histone interaction domain, BBD – BCL6-binding domain. Прочие условные обозначения аналогичны рис. 1. Номера аминокислотных остатков, обозначающих границы доменов и взаимодействующих участков у NCoR, указаны сверху, а у Kaiso и BCL6 снизу. Участки взаимодействия белков обозначены пунктирными линиями.

Kaiso с усеченным С-концом, не содержащим цинковые пальцы (рис. 1). При этом было показано взаимодействие NCoR(1–373) с производными Kaiso(1–579) и Kaiso(1–604), что указывает на то, что в связывании с ко-репрессором принимают участие C2H2 цинковые пальцы Kaiso (рис. 2а).

Интересно, что при взаимодействии ко-репрессора с Kaiso(1–579) рост дрожжей происходит значительно быстрее, чем в случае с Kaiso(1–604). Данный эффект может быть обусловлен тем, что во взаимодействии с ко-репрессором принимает участие второй β-тяж третьего цинкового пальца Kaiso, с которым, исходя из структурных данных, взаимодействует β-тяж из участка 579–604 а.о. и конкурирует с ним за связывание с NCoR. Отсутствие прямого взаимодействия NCoR с изолированными цинковыми пальцами Kaiso, а также с

Kaiso(119–672) можно объяснить необходимостью димеризации Kaiso для эффективного связывания ко-репрессора. Также нельзя исключать вероятного нарушения сворачивания белков при удалении их N-концевых фрагментов, что иногда наблюдается в ДДС.

Полученные результаты свидетельствуют, что механизм взаимодействия NCoR с BTB-содержащим белком Kaiso принципиально отличается от описанного ранее взаимодействия с BCL6, в случае которого с N-концевым BTB-доменом BCL6 связывается консервативный С-концевой участок ко-репрессора (рис. 2б). В отличие от BCL6, в описанном нами взаимодействии N-концевой район NCoR(146–373) связывается с С-концевыми C2H2 цинковыми пальцами Kaiso. При этом в данном взаимодействии не принимает участие BTB-домен Kaiso, однако в предыдущей работе

[2] методом GST pull-down показано, что ВТВ-домен Kaiso взаимодействует с полноразмерным NCoR. Вероятно, ВТВ-домен Kaiso также имеет низкоаффинные сайты связывания в С-концевой области NCoR, детектируемые при высоких концентрациях белка в *in vitro* системе.

Таким образом, NCoR может одновременно взаимодействовать с белками BCL6 и Kaiso, что может увеличивать эффективность рекрутирования NCoR-зависимых репрессорных комплексов на регуляторные элементы, связанные с Kaiso и BCL6. В целом полученные нами данные свидетельствуют о том, что NCoR может использовать различные домены для взаимодействия с транскрипционными факторами, что, вероятно, определяет широкий спектр потенциальных ДНК-связывающих транскрипционных факторов-партнеров NCoR-зависимых репрессорных комплексов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prokhortchouk A., Hendrich B., Jorgensen H., et al. // Genes and Development. 2001. V. 15,13. P. 1613–1618.
2. Yoon H., Chan D., Reynolds A., et al. // Molecular Cell. 2003. V. 12,3. P. 723–734.
3. Mottis A., Mouchiroud L., Auwerx J. // Genes and Development. 2013. V. 27,8. P. 819–835.
4. Yu J., Li Y., Ishizuka T., et al. // EMBO Journal. 2003. V. 22,13. P. 3403–3410.
5. Guenther M.G., Barak O., Lazar M. A. // Molecular and Cellular biology. 2001. V. 21,18. P. 6091–6101.
6. Horlein A.J., Naar A.M., Heinzel T., et al. // Nature. 1995. V. 377. P. 397–404.
7. Park D.M., Li J., Okamoto H., et al. // Cell Cycle. 2007. V. 6,4. P. 467–470.
8. Ahmad K., Melnick A., Lax S., et al. // Molecular Cell. 2003. V. 12,6. P. 1551–1564.
9. Bilic I., Koesters C., Unger B., et al. // Nature Immunology. 2006. V. 7,4. P. 392–400.
10. Huynh K.D., Bardwell V.J. // Oncogene. 1998. V. 17. P. 2473–2484.
11. Zacharchenko T., Wright S. // IUCrJ. 2021. V. 8. P. 154–160.
12. Buck-Koehntop B.A., Stanfield R.L., Ekiert D.C., et al. // PNAS. 2012. V. 109,38. P. 15229–15234.
13. Jumper J., Evans R., Pritzel A., et al. // Nature. 2021. V. 596,7873. P. 583–589.

THE NCoR CO-REPRESSOR INTERACTS WITH THE KAISO TRANSCRIPTION FACTOR THROUGH A MECHANISM DIFFERENT FROM THAT OF BCL6 INTERACTION

K. I. Balagurov^{a,#}, Academician of the RAS P. G. Georgiev^a, and A. N. Bonchuk^a

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

[#]e-mail: kostya.chamomilla@gmail.com

The vertebrate transcription factor Kaiso binds specifically to methylated DNA sequences using C2H2-type zinc fingers. In addition to C2H2-domains, the BTB/POZ domain, which forms homodimers, is located at the N-terminus of Kaiso. Kaiso, like several other well-studied BTB/POZ proteins, including BCL6, interacts with the NCoR (nuclear co-repressor) protein, which determines the landing of transcriptional repressive complexes on chromatin. Using the yeast two-hybrid system, we have shown that the N-terminal domain of NCoR interacts with the C-terminal zinc fingers of Kaiso, and not with its BTB/POZ domain, as previously assumed. The results obtained demonstrate that NCoR interacts with various transcription factor domains, which can increase the efficiency of attracting NCoR-dependent repressor complexes to regulatory regions of the genome.

Keywords: co-repressors, zinc-finger proteins, C2H2-domains, transcription factors, transcriptional repression

УДК 569.426:551.793(477.75)

РАННЕПЛЕЙСТОЦЕНОВЫЙ КОЖАН *EPTESICUS PRAEGLACIALIS* (VESPERTILIONIDAE, CHIROPTERA) ИЗ ПЕЩЕРЫ ТАВРИДА В КРЫМУ

© 2023 г. Академик РАН А. В. Лопатин^{1,*}

Поступило 05.07.2022 г.

После доработки 09.08.2022 г.

Принято к публикации 10.08.2022 г.

Из нижнеплейстоценовых отложений пещеры Таврида в центральном Крыму описаны черепные и нижнечелюстные остатки крупного кожана *Eptesicus praeglacialis* Kormos, 1930. Это первая находка черепов *E. praeglacialis* и первое свидетельство обитания данного вида в Крыму. Судя по степени стирания зубов, в тафоценозе представлены остатки как молодых, так и взрослых особей. Следы зубов мелких млекопитающих на костях (связанные с поеданием остатков мягких тканей) при отсутствии признаков дигестии, характерной для материалов из погадок хищных птиц, указывают, что в тафоценоз попали остатки погибших в пещере особей *E. praeglacialis*, которые использовали ее в качестве укрытия. Это соответствует представлениям о появлении на рубеже плиоцена и плейстоцена у некоторых лесных форм европейских летучих мышей (включая *Eptesicus*) климатически обусловленной экологической адаптации — гибернации в пещерах.

Ключевые слова: *Eptesicus praeglacialis*, летучие мыши, плейстоцен, Крым, строение черепа, стирание зубов, возрастная изменчивость, следы зубов, гибернация

DOI: 10.31857/S268673892206018X, **EDN:** TKTYSB

Изучение остатков раннеплейстоценовых рукокрылых из пещеры Таврида в центральном Крыму (Белогорский район, пос. Зуя) позволило описать новый подвид подковоносов *Rhinolophus macrorhinus cimmerius* Lopatin, 2022 (Rhinolophidae) и установить присутствие гладконосых летучих мышей родов *Eptesicus*, *Plecotus* и *Myotis* (Vespertilionidae) [1].

В настоящей статье описываются черепные и нижнечелюстные остатки крупных кожанов *Eptesicus praeglacialis* Kormos, 1930 из нижнеплейстоценовых отложений пещеры Таврида (сборы 2018, 2020 и 2021 гг.). Возраст фаунистического комплекса определен в пределах позднего виллафранка, около 1.8–1.5 млн л.н. [2, 3].

Изученный материал хранится в Палеонтологическом институте им. А.А. Борисяка РАН (ПИН) в г. Москве. Терминология строения зубов по [4]. Размеры приведены в мм. Иллюстрации подготовлены при помощи цифрового фотоаппарата Nikon D800 с объективом AF-S Micro NIKKOR 60mm f/2.8G ED, сканирующего электронного микроскопа Tescan Vega 3 XMU и рентгеновского микротомографа Neoscan N80 в ПИН.

Отряд Chiroptera Blumenbach, 1779
Семейство Vespertilionidae Gray, 1821
Подсемейство Vespertilioninae Gray, 1821
Триба Eptesicini Volleth et Heller, 1994

Род *Eptesicus* Rafinesque, 1820
Eptesicus praeglacialis Kormos, 1930

Eptesicus n. sp.: [5: с. 500].

Eptesicus praeglacialis n. sp.: [6: с. 237].

Голотип — Венгерский геологический институт, Будапешт, № 06/4728 [7: с. 56]; левая нижнечелюстная кость с P₄—M₃ и восходящей ветвью; Румыния, Бихор, местонахождение Бетфия 2, или Сомлёберг (Somlyóberg), близ Пюспёкфюрдо (Püspökfürdő); нижний плейстоцен.

Описание (рис. 1–4). Размеры крупные, заметно больше, чем у современного *E. serotinus* (Schreber, 1774). Череп массивный, низкий, мозговая коробка удлиненная, широкая (существенно шире лицевого отдела), куполовидно выпуклая в задней части, с легкими вздутиями позади межглазничного промежутка. Заглазничное сужение хорошо выражено. Ширина черепа в скуловых дугах намного превосходит ширину в мастоидных отростках.

Лицевой отдел черепа крупный, ростральная часть широкая, с дорсальной стороны слегка вогнутая, с четкой продольно вытянутой узкой срединной впадиной. Клыки широко расставленные. Вырезка носового отверстия сравнительно

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

*e-mail: alop@paleo.ru

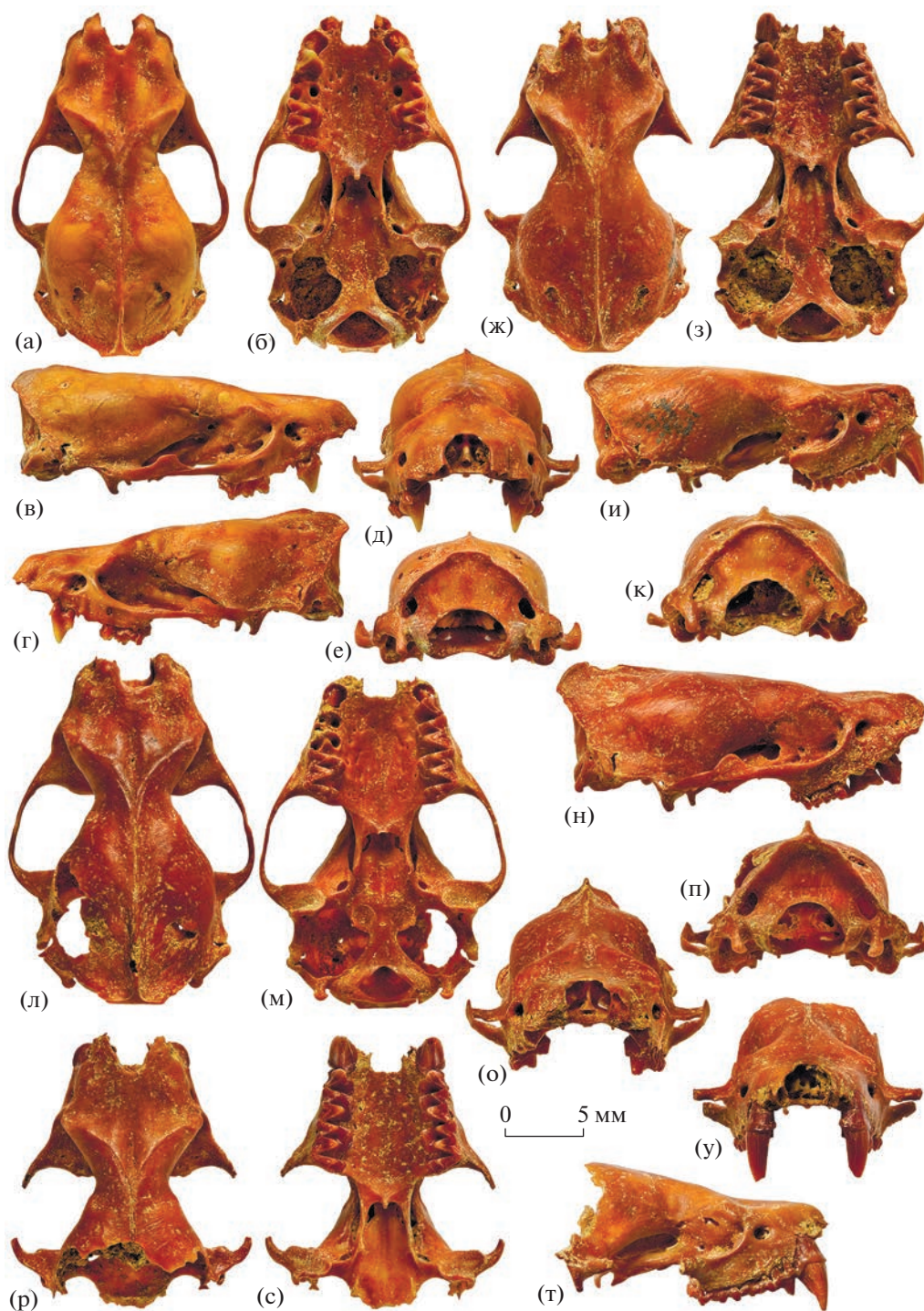


Рис. 1. *Eptesicus praeglacialis* Kormos, 1930: а–е – экз. ПИН, № 5644/741, череп с правыми и левыми P^4 и M^2-M^3 : а – с дорсальной стороны, б – с вентральной стороны, в – с правой латеральной стороны, г – с левой латеральной стороны, д – с роstralной стороны, е – с затылочной стороны; ж–к – экз. ПИН, № 5644/742, череп с правыми C^1-M^2 и левыми P^4-M^3 : ж – с дорсальной стороны, з – с вентральной стороны, и – с правой латеральной стороны, к – с затылочной стороны; л–п – экз. ПИН, № 5644/743, череп с левыми P^4-M^3 и правыми M^2-M^3 : л – с дорсальной стороны, м – с вентральной стороны, н – с правой латеральной стороны, о – с роstralной стороны, п – с затылочной стороны; р–у – экз. ПИН, № 5644/744, неполный череп с правыми и левыми C^1-M^3 : р – с дорсальной стороны, с – с вентральной стороны, т – с правой латеральной стороны, у – с роstralной стороны; Россия, Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен.



Рис. 2. *Epptesicus praeglacialis* Kormos, 1930: а–г – экз. ПИН, № 5644/745, неполный череп с правыми и левыми C^1 – M^3 : а – с дорсальной стороны, б – с вентральной стороны, в – с левой латеральной стороны, г – с роstralной стороны; д–л – экз. ПИН, № 5644/746, неполный череп с правыми C^1 – M^1 и левыми C^1 – P^4 : д – с дорсальной стороны, е – с вентральной стороны, ж – с правой латеральной стороны, з – с роstralной стороны; и–л: компьютерная томография: и, к – левая половина носовой полости: и – сагиттальная проекция, вблизи носовой перегородки (видны этмотурбиналии I, II и III); к – сагиттальная проекция, более латерально (видны сечения этмотурбиналий и максиллотурбиналии); л – носовая полость, аксиальная проекция на уровне M^1 ; Россия, Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен.

неглубокая, V-образной или U-образной формы. Лобные кости расширены над глазами и в месте наибольшего латерального расширения формируют умеренно развитые предглазничные отростки. Надглазничные гребни хорошо выраженные. Сагиттальный гребень низкий почти на всем протяжении, но высокий в наиболее задней части, которая заметно выступает дистально, нависая над затылком (рис. 1в, 1г, 1и, 1н). Затылочные гребни высокие, резкие, их соединенные с окончанием сагиттального гребня поперечные порции короткие, прямые (рис. 1а, 1ж, 1л). Теменные отверстия крупные, раздвоенные.

Подглазничное отверстие крупное, округлое, расположено на уровне задней части P^4 и переднего края M^1 . Костный мостик, отделяющий подглазничное отверстие от глазницы, короткий, но массивный. Округлое слезное отверстие находится внутри глазницы, на уровне середины или задней части M^1 . Скуловая дуга относительно прямая, низкая и тонкая, в ее средней части четко выделяется высокий и крупный заглазничный отросток трапециевидной, округло-треугольной или полукруглой формы (рис. 1в, 1г, 1н).

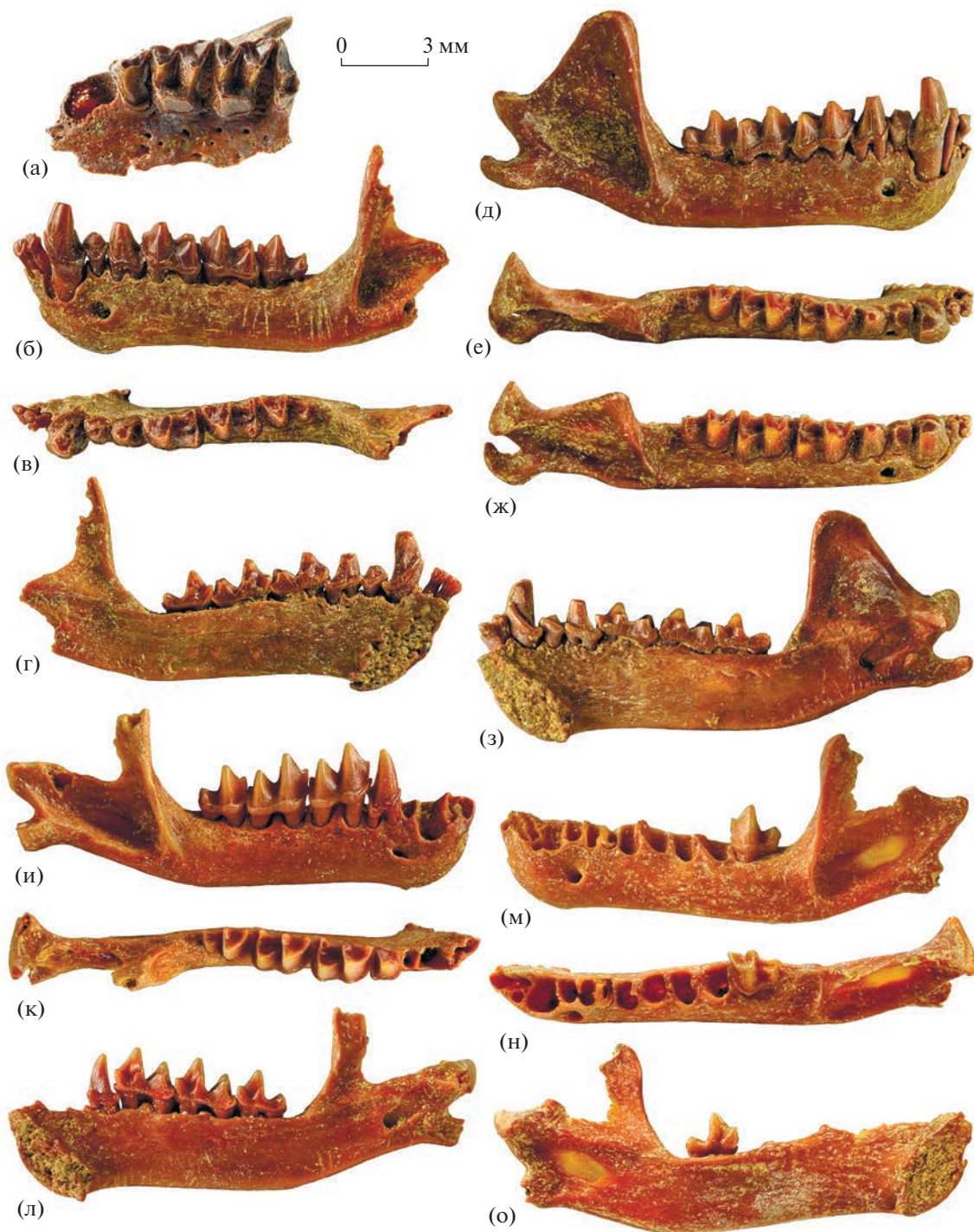


Рис. 3. *Eptesicus praeglacialis* Kormos, 1930: а – экз. ПИН, № 5644/747, фрагмент левой верхнечелюстной кости с P^4-M^3 с окклюзионной стороны; б–г – экз. ПИН, № 5644/751, левая нижнечелюстная кость с I_1-I_2 и C_1-M_3 : б – с лабиальной стороны, в – с окклюзионной стороны, г – с лингвальной стороны; д–з – экз. ПИН, № 5644/750, правая нижнечелюстная кость с I_2-M_3 : д – с лабиальной стороны, е – с окклюзионной стороны, ж – с окклюзионной стороны с лингвальным наклоном, з – с лингвальной стороны; и–л – экз. ПИН, № 5644/752, правая нижнечелюстная кость с P_4-M_3 : и – с лабиальной стороны, к – с окклюзионной стороны, л – с лингвальной стороны; м–о – экз. ПИН, № 5644/753, левая нижнечелюстная кость с M_3 : м – с лабиальной стороны, н – с окклюзионной стороны, о – с лингвальной стороны; Россия, Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен.

Задний край U-образной передней небной вырезки находится на уровне середины C^1 . Костное небо длинное, оканчивается немного дистальнее уровня заглазничного сужения. Срединный шип костного неба хорошо выраженный, но сравнительно короткий. Мезоптеригоидная ямка широкая, крыловидные отростки хорошо развитые, с немного отклоненными медиально задними концами (рис. 1б, 1с). Суставные впадины сравнительно небольшие. Боковые затылочные отростки короткие, не выступают дистальнее или вентральнее затылочных мышцелков.

Носовые раковины (турбиналии) характерно для Vespertilionidae строения [8: рис. 7D, 7H]; на компьютерных томографических срезах (рис. 2и–2л) хорошо различимы крупные этмотурбиналии I, II и III, вместе занимающие значительную часть объема задней половины носовой полости, а также продольно вытянутая максиллотурбиналия вблизи дна носовой полости.

Верхний зубной ряд включает два резца, клык, один премоляр и три моляра (рис. 1з, 1с, 2б, 3а, 4а); верхний малый премоляр отсутствует. Ряд C^1 – P^4 по длине в 1.5 раза уступает ряду M^1 – M^3 .

Судя по альвеолам, верхние резцы I^1 и I^2 тесно сближены и располагаются примерно на одной поперечной линии. Альвеола I^1 немного крупнее альвеолы I^2 . Альвеола C^1 отделена от альвеолы I^2 небольшим промежутком; поверхность кости на месте этого промежутка вогнутая, с множеством мелких ямок.

Верхний клык C^1 массивный, высокий, слегка загнут постеролингвально. Лабиальная сторона полукруглая, лингвальная сторона отчетливо вогнута в задней части. От вершины отходят четыре резких субвертикальных гребня — передний, антеролингвальный, толстый лабиальный и особенно мощный задний гребень, который соединяется с хорошо развитым задним выступом коронки. Цингулом мощный, волнообразно изогнутый.

Верхний большой премоляр P^4 вдвое ниже C^1 , короткий и относительно узкий, с субтреугольной окклюзионной поверхностью, с крупным полукруглым талоном и узким непрерывным цингулом. Парастиль мелкий, гребень постпаракристы длинный, высокий. Имеется отчетливая задняя вырезка.

Верхние моляры M^1 и M^2 массивные, с трапециевидной окклюзионной поверхностью. Стили крупные, выступ гипокона хорошо развит. Цингулом узкий. M^2 расширен поперечно сильнее, чем M^1 , парастиль на M^2 вытянут существенно больше (поэтому W-образная фигура из гребней паракона и метакона выражена лучше). На M^1 выступ гипокона выдается лингвально сильнее, чем протокон, тогда как на M^2 , напротив, сильнее выступает протокон. Задняя вырезка очень слабая.

M^3 сильно редуцированный, узко-треугольный, вытянутый поперечно, с крупным парасти-

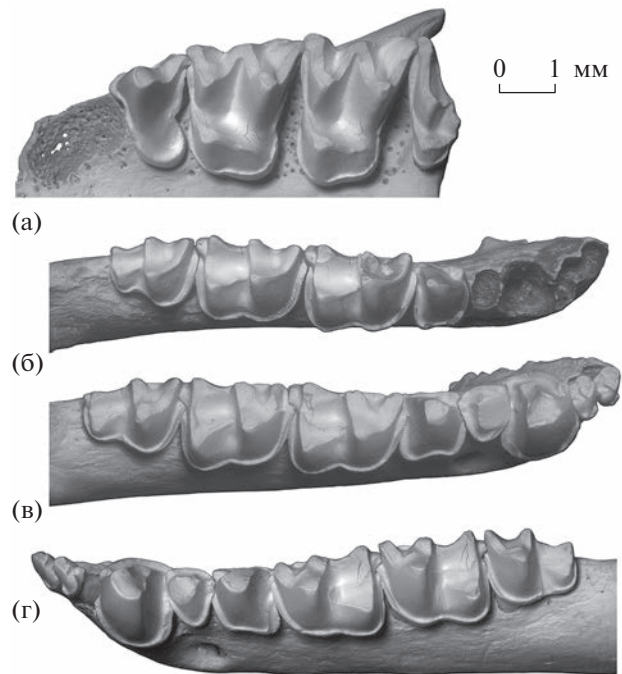


Рис. 4. *Eptesicus praeglacialis* Kormos, 1930, зубные ряды с окклюзионной стороны: а — экз. ПИН, № 5644/747, слабо стертые левые P^4 – M^3 и альвеола C^1 ; б — экз. ПИН, № 5644/752, нестертые правые P_4 – M_3 и альвеолы I_1 – P_2 ; в — экз. ПИН, № 5644/750, умеренно стертые правые I_2 – M_3 и альвеола I_1 ; г — экз. ПИН, № 5644/751, умеренно стертые левые I_1 – I_2 и C_1 – M_3 и альвеола I_3 ; Россия, Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен.

лярным выступом, конец которого охватывает метастиль M^2 . На M^3 метастиль отсутствует, метакон очень мелкий. Цингулом на передней и лингвальной сторонах тонкий, но отчетливый; на постеролабиальной стороне (на участке от парастилия до метакона) цингулом очень слабый, на уровне метакона отсутствует или едва намечен.

Горизонтальная ветвь нижнечелюстной кости относительно короткая и высокая, со слегка вогнутым в средней части вентральным краем и мощно развитым высоким подбородочным выступом (рис. 3б, 3д, 3и, 3м). Подбородочное отверстие относительно мелкое, округлое, расположено под P_2 или промежутком P_2/P_4 . Симфиз крупный, достигает уровня P_2 или передней части P_4 . Нижнечелюстное отверстие мелкое, щелевидное, располагается немного вентральнее уровня альвеолярного края кости.

Восходящая ветвь нижнечелюстной кости высокая и длинная. Венечный отросток треугольный, с субвертикальным передним краем, относительно узкой вершиной и пологим задним склоном. Массетерная впадина глубокая, обрамляющие ее гребни высокие, мощные. Впадина височной мышцы глубокая и обширная, вен-

трально ограничена хорошо развитым медиальным гребнем, тянущимся от основания венечного отростка до суставного мыщелка. Сочленовный отросток короткий, суставный мыщелок широкий. Длина постдентальной части нижнечелюстной кости (расстояние от M_3 до заднего края суставного мыщелка) на 10–15% превышает длину M_1-M_3 . Угловой отросток широкий и массивный в основании, с узким концом, длинный, крючковидно загнутый дорсомедиально, заметно выступает дистально за задний край суставного мыщелка. На медиальной стороне основания углового отростка имеется отчетливая бороздка, которая протягивается от уровня нижнечелюстного отверстия до уровня вырезки между сочленовным и угловым отростками. На латеральной стороне углового отростка располагаются два мощных продольных гребня, дорсальный и вентральный. Они начинаются на уровне шейки мыщелка и сливаются под его головкой, а далее единый гребень тянется до окончания углового отростка, ограничивая (вместе с дорсальным гребнем) довольно обширную вогнутую площадку на его дорсолатеральной поверхности.

Нижний зубной ряд состоит из трех резцов, клыка, двух премоляров и трех моляров (рис. 3б–3з, 4б–4г). Длина ряда C_1-P_4 приблизительно в 1.7–1.8 раза меньше длины ряда M_1-M_3 .

Нижние резцы мелкие, заметно наклонены вперед. Альвеолы I_1 и I_2 тесно сближены, коронка I_2 частично перекрывает коронку I_1 . Альвеола I_3 сильно смещена лабиально, но при этом корень I_3 наклонен лингвально, в результате чего I_3 налегает на I_2 и коронки всех трех резцов формируют единую дугу.

Коронки нижних резцов трехлопастные, лабиально выпуклые, приблизительно одинаковых размеров. Лабиальная доля крупнее двух других. На задней стороне каждого резца имеется мелкий дополнительный бугорок, расположенный на уровне границы между лабиальной и срединной долями. На антеролабиальной стороне находится отчетливый цингулид, на I_2 и I_3 в его пределах развит дополнительный цингулярный бугорок. I_3 тесно прилегает к C_1 .

Нижний клык C_1 массивный, высокий, субвертикальный. Основание коронки округло-треугольное, передний и боковые края выпуклые, задний край почти прямой. Имеется слабо выраженный антеролангинальный дополнительный бугорок. Задняя стенка главного бугорка немного вогнутая, с мощным постеролангинальным ребром, на котором при стирании формируется широкий гребень. В постеролангинальном углу короткого заднего выступа коронки располагается мелкий дополнительный бугорок. Цингулид мощно развит на всех сторонах, но отсутствует в месте смыкания C_1 с коронкой I_3 .

Нижний малый премоляр P_2 однокорневой, однобугорковый, приблизительно в 2.2 раза ниже C_1 . Коронка широкая, с округло-треугольной окклюзионной поверхностью (лингвальная сторона существенно длиннее лабиальной). Цингулид широкий, непрерывный, на его антеролангинальном и заднем выступах имеются маленькие цингулярные бугорки.

Нижний большой премоляр P_4 приблизительно в 1.4 раза уступает по высоте C_1 . Основание коронки P_4 округленно-квадратное, с непрерывным мощным цингулидом и антеролангинальным дополнительным бугорком. Вершина главного бугорка остроконечная (плоская при стирании), антеролабиальная сторона выпуклая, лингвальная сторона прямая, ограничена резкими передним и постеролангинальными ребрами, задняя сторона немного вогнутая. Задний выступ коронки короткий, с выступающим постеролангинальным дополнительным бугорком.

Нижние моляры массивные, миотодонтного типа, с мощным эктоцингулидом и в разной степени развитым энтоцингулидом под выходом из широко открытого тригонидного бассейна. Талонидный бассейн закрыт высоким энтокристидом. M_1 и M_2 приблизительно равной длины, с выступающим постеролангинальным крупным гипоконулидом; паракристид на M_1 короче, чем на M_2 , косо кристид присоединен к задней стенке тригониды более лабиально. M_3 относительно короткий, с узким двухбугорковым талонидом (иногда имеется крохотный гипоконулид, см. рис. 3ж, 4в); косо кристид присоединен к средней части задней стенки тригониды.

Размеры в мм. Экз. ПИН, № 5644/741: наибольшая длина черепа – 21.85; кондильо-базальная длина – 21.6; кондильо-канини-ная длина – 20.3; основная длина (от передней небной вырезки до большого затылочного отверстия) – 17.0; длина ро-струма (до заднего края небного отростка верхнечелюстной кости) – 9.5; длина костного неба (от передней небной вырезки до основания срединного шипа) – 8.5; длина суставной впадины (dex – правая, sin – левая) – 1.7 (dex, sin); ширина суставной впадины – 2.8 (dex, sin); межглазничная ширина (в заглазничном сужении) – 4.8; ширина в скуловых дугах – 14.2; ширина мозговой коробки – 10.5; ширина в мастоидных отростках – 11.4; ширина на уровне M^2-M^2 – 9.0; ширина мезоптеригойдной ямки (между основаниями крыловидных отростков) – 2.9; ширина большого затылочного отверстия – 4.5; высота мозговой коробки (от вентрального края затылочного мыщелка до вершины сагиттального гребня) – 7.5; длина P^4-M^3 – 6.5 (dex), 6.4 (sin). Размеры зубов (L – длина, W – ширина, H – высота): P^4 (dex): L – 1.8; W – 1.9; P^4 (sin): L – 1.7; W – 1.9; M^2 (dex):

L — 2.3; W — 2.7; M² (sin): L — 2.2; W — 2.7; M³ (dex): L — 1.0; W — 2.6; M³ (sin): L — 1.0; W — 2.5.

Экз. ПИН, № 5644/742: наибольшая длина черепа — более 21.0 (ростром обломан); кондилоканинная длина — 19.8; основная длина — 17.0; длина костного неба — 8.3; длина суставной впадины — 1.6 (sin); ширина суставной впадины — 3.0 (sin); межглазничная ширина — 4.95; ширина мозговой коробки — 11.6; ширина в мастоидных отростках — 12.7; ширина на уровне M²—M² — 9.2; ширина мезоптеригоидной ямки — 2.9; ширина большого затылочного отверстия — 4.5; высота мозговой коробки — 7.8; длина C¹—P⁴ — 3.55 (dex); длина P⁴—M³ — 6.7 (sin); длина M¹—M³ — 5.5 (sin). Отношение длины M¹—M³ к длине C¹—P⁴ — 1.55. Размеры зубов: C¹ (dex): L — 2.2; W — 1.6; H — 3.4; P⁴ (dex): L — 1.5; W — 2.0; P⁴ (sin): L — 1.5; W — 2.1; M¹ (dex): L — 2.3; W — 2.6; M¹ (sin): L — 2.4; W — 2.5; M² (dex): L — 2.2; W — 2.8; M² (sin): L — 2.4; W — 2.8; M³ (sin): L — 1.2; W — 2.5.

Экз. ПИН, № 5644/743: наибольшая длина черепа — 22.5; кондилоканинная длина — 20.8; основная длина — 17.5; длина роострума — 9.5; длина костного неба — 9.0; длина суставной впадины — 1.7 (dex, sin); ширина суставной впадины — 3.2 (dex, sin); межглазничная ширина — 4.85; ширина в скуловых дугах — 15.6; ширина мозговой коробки — 11.4; ширина в мастоидных отростках — 12.3; ширина на уровне M²—M² — 9.6; ширина мезоптеригоидной ямки — 2.9; ширина большого затылочного отверстия — 4.5; высота мозговой коробки — 8.1; длина P⁴—M³ — 6.8 (sin); длина M¹—M³ — 5.3 (sin). Размеры зубов: P⁴ (sin): L — 1.65; W — 2.2; M¹ (sin): L — 2.35; W — 2.6; M² (dex): L — 2.3; W — 2.75; M² (sin): L — 2.25; W — 2.85; M³ (dex): L — 1.05; W — 2.5; M³ (sin): L — 1.1; W — 2.6.

Экз. ПИН, № 5644/744: длина роострума — 9.0; длина костного неба — 8.7; межглазничная ширина — 4.7; ширина на уровне C¹—C¹ — 7.6; ширина на уровне M²—M² — 9.4; длина C¹—M³ — 8.75 (dex), 8.65 (sin); длина C¹—P⁴ — 3.6 (dex, sin); длина P⁴—M³ — 6.7 (dex), 6.65 (sin); длина M¹—M³ — 5.4 (dex, sin). Отношение длины M¹—M³ к длине C¹—P⁴ — 1.5 (dex, sin). Размеры зубов: C¹ (dex): L — 2.25; W — 1.9; H — 3.5; C¹ (sin): L — 2.25; W — 2.0; H — 3.3; P⁴ (dex): L — 1.6; W — 2.2; P⁴ (sin): L — 1.6; W — 2.15; M¹ (dex): L — 2.25; W — 2.55; M¹ (sin): L — 2.25; W — 2.5; M² (dex, sin): L — 2.2; W — 2.8; M³ (dex): L — 1.1; W — 2.55; M³ (sin): L — 1.05; W — 2.55.

Экз. ПИН, № 5644/745: длина роострума — 9.0; длина костного неба — 8.3; межглазничная ширина — 4.9; ширина на уровне C¹—C¹ — 7.0; ширина на уровне M²—M² — 8.6; длина C¹—M³ — 8.2 (dex), 8.3 (sin); длина C¹—P⁴ — 3.3 (dex, sin); длина P⁴—M³ — 6.4 (dex), 6.5 (sin); длина M¹—M³ — 5.0 (dex), 5.05 (sin). Отношение длины M¹—M³ к длине C¹—P⁴ —

1.52 (dex), 1.53 (sin). Размеры зубов: C¹ (dex): L — 2.25; W — 1.7; H — 3.4; C¹ (sin): L — 2.15; W — 1.7; H — 3.4; P⁴ (dex): L — 1.5; W — 2.0; P⁴ (sin): L — 1.6; W — 2.0; M¹ (dex, sin): L — 2.25; W — 2.45; M² (dex): L — 2.25; W — 2.75; M² (sin): L — 2.25; W — 2.7; M³ (dex, sin): L — 0.9; W — 2.5.

Экз. ПИН, № 5644/746: длина костного неба — 8.4; ширина на уровне C¹—C¹ — 7.65; длина C¹—P⁴ — 3.85 (dex), 3.8 (sin). Размеры зубов: C¹ (dex): L — 2.35; W — 1.85; H — 3.15; C¹ (sin): L — 2.25; W — 1.85; H — 3.2; P⁴ (dex): L — 1.85; W — 2.2; P⁴ (sin): L — 1.85; W — 2.15; M¹ (dex): L — 2.45; W — 2.7.

Экз. ПИН, № 5644/757, C¹ (dex): L — 2.4; W — 1.9; H — 3.55.

Экз. ПИН, № 5644/758, C¹ (dex): L — 2.2; W — 1.9; H — 3.7.

Экз. ПИН, № 5644/747 (sin): длина P⁴—M³ — 6.6; длина M¹—M³ — 5.2. Размеры зубов: P⁴: L — 1.5; W — 2.1; M¹: L — 2.25; W — 2.6; M²: L — 2.2; W — 2.85; M³: L — 1.05; W — 2.45.

Экз. ПИН, № 5644/748 (sin): P⁴: L — 1.75; W — 2.25; M¹: L — 2.35; W — 2.7.

Экз. ПИН, № 5644/749 (sin): P⁴: L — 1.65; W — 2.2.

Экз. ПИН, № 5644/750 (dex): длина нижнечелюстной кости — 16.7; длина I₂—I₃ — 0.95; C₁—M₃ — 9.4; C₁—P₄ — 3.4; P₂—M₃ — 8.1; P₂—P₄ — 2.1; P₄—M₃ — 7.3; M₁—M₃ — 6.2; постдентальная длина — 6.6; расстояние от переднего края вершины венечного отростка до заднего края суставного мышелка (плечо силы височной мышцы) — 5.7; расстояние от переднего края головки суставного мышелка до ventрального края углового отростка (плечо силы массетера) — 3.2; высота горизонтальной ветви под P₂ — 2.9, под M₃ — 2.6; высота в венечном отростке — 6.4; ширина суставного мышелка — 2.65. Отношение длины M₁—M₃ к длине C₁—P₄ — 1.82. Размеры зубов: I₂: лабиолингвальная длина (LL) — 0.5; W — 0.8; I₃: LL — 0.5; W — 0.9; C₁: L — 1.5; W — 1.75; P₂: L — 1.0; W — 1.15; P₄: L — 1.3; W — 1.35; M₁: L — 2.2; W — 1.6; M₂: W — 1.6; M₃: L — 1.9; ширина тригонида (WTR) — 1.3; ширина талонида (WTAL) — 0.9.

Экз. ПИН, № 5644/751 (sin): длина I₁—M₃ — 10.4; I₁—C₁ — 2.3; I₁—I₂ — 1.0; C₁—M₃ — 9.25; C₁—P₄ — 3.45; P₂—M₃ — 7.9; P₂—P₄ — 2.1; P₄—M₃ — 7.0; M₁—M₃ — 5.9; высота горизонтальной ветви под P₂ — 2.8, под M₃ — 2.5. Отношение длины M₁—M₃ к длине C₁—P₄ — 1.71. Размеры зубов: I₁: LL — 0.5; W — 0.8; I₂: LL — 0.55; W — 0.75; C₁: L — 1.5; W — 1.7; P₂: L — 0.95; W — 1.1; P₄: L — 1.25; W — 1.25; M₁: L — 2.1; W — 1.55; M₂: L — 2.05; W — 1.6; M₃: L — 1.7; WTR — 1.35; WTAL — 0.9.

Экз. ПИН, № 5644/752 (dex): длина нижнечелюстной кости — 16.2; длина P₄—M₃ — 7.05; M₁—

Таблица 1. Размеры (в мм) *Eptesicus praeglacialis* Kormos, 1930 из нижнего плейстоцена пещеры Таврида, Крым (n — число экземпляров)

Параметры	n	пределы	среднее
Длина костного неба	6	8.3–9.0	8.53
Межглазничная ширина	5	4.7–4.95	4.84
Ширина на уровне C^1 – C^1	3	7.0–7.65	7.42
Ширина на уровне M^2 – M^2	5	8.6–9.6	9.16
Длина C^1 – M^3	4	8.2–8.75	8.48
Длина C^1 – P^4	7	3.3–3.85	3.57
Длина P^4 – M^3	9	6.4–6.8	6.58
Длина M^1 – M^3	7	5.0–5.5	5.26
Длина C^1	9	2.15–2.4	2.26
Ширина C^1	9	1.6–2.0	1.82
Длина P^4	14	1.5–1.85	1.65
Ширина P^4	14	1.9–2.25	2.1
Длина M^1	10	2.25–2.45	2.31
Ширина M^1	10	2.45–2.7	2.57
Длина M^2	11	2.2–2.4	2.25
Ширина M^2	11	2.7–2.85	2.77
Длина M^3	10	0.9–1.2	1.04
Ширина M^3	10	2.45–2.6	2.53
Длина P_4 – M_3	3	7.0–7.3	7.12
Длина M_1 – M_3	3	5.9–6.2	6.07
Длина P_4	4	1.15–1.3	1.25
Ширина P_4	4	1.25–1.35	1.31
Длина M_1	4	2.1–2.2	2.15
Ширина талонида M_1	4	1.55–1.7	1.6
Длина M_2	3	2.05–2.15	2.12
Ширина талонида M_2	4	1.6–1.7	1.64
Длина M_3	5	1.7–1.9	1.77
Ширина тригонида M_3	5	1.3–1.35	1.33
Ширина талонида M_3	5	0.75–0.9	0.86
Постдентальная длина	3	6.5–6.7	6.6

M_3 — 6.1; постдентальная длина — 6.7; высота горизонтальной ветви под P_2 — 2.6, под M_3 — 2.4; ширина суставного мышелка — 2.4. Размеры зубов: P_4 : L — 1.15; W — 1.3; M_1 : L — 2.15; W — 1.7; M_2 : L — 2.15; W — 1.65; M_3 : L — 1.7; WTR — 1.35; $WTAL$ — 0.9.

Экз. ПИН, № 5644/753 (sin): длина нижнечелюстной кости — 16.35; альвеолярная длина: I_1 – M_3 — 9.8; C_1 – M_3 — 8.7; P_4 – M_3 — 6.85; M_1 – M_3 — 5.6; постдентальная длина — 6.5; расстояние от переднего края вершины венечного отростка до заднего края суставного мышелка — 5.6; высота горизонтальной ветви под P_2 — 2.5, под M_3 — 2.3; высо-

та в венечном отростке — 6.1; ширина суставного мышелка — 2.4. Размеры M_3 : L — 1.8; WTR — 1.3; $WTAL$ — 0.75.

Экз. ПИН, № 5644/754 (dex): альвеолярная длина: I_1 – M_3 — 9.6; C_1 – M_3 — 8.7; высота горизонтальной ветви под P_2 — 2.8, под M_3 — 2.6.

Экз. ПИН, № 5644/755 (dex): высота горизонтальной ветви под M_3 — 2.6. Размеры зубов: M_2 : L — 2.15; W — 1.7; M_3 : L — 1.75; WTR — 1.35; $WTAL$ — 0.85.

Экз. ПИН, № 5644/759, P_4 (dex): L — 1.3; W — 1.35.

Экз. ПИН, № 5644/760, M_1 (dex): L — 2.15; W — 1.55.

Статистические данные представлены в табл. 1.

Изменчивость. Возрастная изменчивость зубов, обусловленная их стиранием, выражается в увеличении площади фасеток стирания и уменьшении высоты бугорков. По степени стирания верхних клыков для представителей рода *Eptesicus* выделяются шесть категорий, или классов, стирания [9, 10]: (1) клыки с острой вершиной; (2) клыки с округлой вершиной; (3–6) клыки с плоской вершиной, стертые: (3) на 1/8–1/7 высоты коронки, (4) на 1/6–1/5 высоты коронки, (5) на 1/4–1/3 высоты коронки, (6) на 1/2 высоты коронки и более. По этой классификации экз. ПИН, №№ 5644/742, 744 и 745 относятся к категории 3, а экз. ПИН, № 5644/746 — к категории 4 (рис. 1у, 2г, 2з). Изолированные верхние клыки могут быть отнесены к категориям 2 (экз. ПИН, № 5644/758) и 3 (экз. ПИН, № 5644/757). Так как стирание клыков зависит от локальных и сезонных особенностей питания, прямое сопоставление классов стирания с возрастом в годах затруднительно [10], однако очевидно, что первые две категории относятся к молодым особям первых лет жизни, а последующие — к взрослым и старым особям [9].

Фрагмент нижнечелюстной кости экз. ПИН, № 5644/752 с нестертыми P_4 – M_3 (рис. 3и–3л, 4б) явно принадлежит молодой особи первого года жизни.

Сравнение и замечания. Вид *E. praeglacialis* был кратко описан [6] из нижнего плейстоцена Румынии (Бетфия 2) по фрагменту нижнечелюстной кости с P_4 – M_3 (без изображения). Сведения о другом типовом местонахождении [11: с. 155] и ином месте хранения голотипа [12: с. 89] ошибочны [7, 13].

Позже *E. praeglacialis* был идентифицирован (по большей части, без иллюстраций и морфологической характеристики) в нижнем плейстоцене Венгрии [14], Австрии [15], Мальты [16–18]. *Eptesicus* cf. *praeglacialis* был описан по изолированным верхним и нижним зубам из нижнего и среднего плейстоцена Венгрии [7].

Отнесение крымского раннеплейстоценового кожана к *E. praeglacialis* основывается на соответствующей величине (размеры голотипа в мм: длина нижнечелюстной кости — 16.7, альвеолярная длина C_1-M_3 — 8.85, длина P_4-M_3 — 7.05, длина M_1-M_3 — 6.1) [6, 19] и идентичных признаках нижнечелюстной кости (подбородочное отверстие под нижним малым премоляром; глубокая массетерная впадина; очень глубокая впадина височной мышцы с мощным медиальным гребнем; относительно узкая вершина венечного отростка; широкий угловой отросток с бороздкой на медиальной стороне и двумя резкими гребнями на латеральной стороне) и нижних коренных зубов (массивные, с мощным цингулидом), диагностических для данного вида [6]. Указанные признаки и крупные размеры (особенно крупные зубные ряды) отличают *E. praeglacialis* от наиболее близкого по величине и морфологии рецентного вида *E. serotinus* (Schreber, 1774), в ископаемом состоянии известного со среднего плейстоцена [20], а также от вымерших видов из плиоцена Европы (*E. kowalskii* Wołoszyn, 1987 и *E. mossoczyi* Wołoszyn, 1987) [11, 19].

Современный крупный кожан *E. serotinus*, сближаемый с *E. praeglacialis*, широко распространен как в открытых ландшафтах, так и в лесных местообитаниях и эпизодически использует пещеры для гибернации. Вместе с тем остатки *E. serotinus* обычны в пещерных тафоценозах погачочного происхождения, так как летучие мыши этого вида регулярно становятся добычей сов [19]. По числу остатков *E. praeglacialis* на порядок уступает наиболее многочисленным видам раннеплейстоценовых рукокрылых из пещеры Таврида — *Rhinolophus macrorhinus* Torál, 1963 и *Myotis* spp., но при этом представлен значительным числом образцов хорошей сохранности (почти целых черепов и нижнечелюстных костей), без каких-либо признаков дигестии, свойственной погачочным материалам. Некоторые экземпляры *E. praeglacialis* из пещеры Таврида несут следы зубов мелких млекопитающих. Довольно длинные, субпараллельные, плотно расположенные (частично перекрывающиеся) узкие поверхностные бороздки отмечаются на теменных костях неполного черепа экз. ПИН, № 5644/744 (рис. 1р). Короткие широкие бороздки располагаются на левой стороне дорсальной поверхности ростральной части черепа экз. ПИН, № 5644/745 (рис. 2а). На некоторых нижнечелюстных костях тонкие бороздки разной длины, субперпендикулярные вентральному краю кости, фиксируются на лабиальной и лингвальной сторонах горизонтальной ветви вблизи восходящей ветви (экз. ПИН, №№ 5644/750–752; рис. 3б, 3д, 3з, 3л), а также за симфизной областью (экз. ПИН, № 5644/752; рис. 3л); сходные бороздки отмечены на венечном отростке нижнечелюстной кости экз. ПИН, № 5644/750 (рис. 3д). Судя по глубине

и локализации, все эти следы зубов представляют собой свидетельства избирательного поедания сохранившихся на костях остатков мягких тканей и не связаны с остеофагией. Так как в результате дигестии костный материал из погадок хищных птиц обычно полностью очищен от мягких тканей, наличие таких следов питания может указывать, что в тафоценоз попали остатки погибших в пещере особей *E. praeglacialis*, которые использовали ее в качестве укрытия. Это соответствует основанным на анализе тафономии европейских местонахождений представлениям о появлении на рубеже плиоцена и плейстоцена у некоторых лесных форм летучих мышей (*Pipistrellus*, *Vespertilio*, *Nyctalus*, *Eptesicus*) климатически обусловленной экологической адаптации — гибернации в пещерах [11].

Распространение. Нижний плейстоцен Европы.

Материал. Из пещеры Таврида 20 экземпляров, в том числе три почти целых черепа (без слуховых барабанов): с правыми и левыми P^4 и M^2-M^3 (экз. ПИН, № 5644/741), с правыми C^1-M^2 и левыми P^4-M^3 (экз. ПИН, № 5644/742), с левыми P^4-M^3 и правыми M^2-M^3 (экз. ПИН, № 5644/743); три неполных черепа: с правыми и левыми C^1-M^3 (экз. ПИН, №№ 5644/744, 745), с правыми C^1-M^1 и левыми C^1-P^4 (экз. ПИН, № 5644/746); три фрагмента верхнечелюстных костей: с P^4-M^3 (экз. ПИН, № 5644/747), с P^4-M^1 (экз. ПИН, № 5644/748), с P^4 (экз. ПИН, № 5644/749); пять полных или почти полных нижнечелюстных костей: с I_2-M_3 и целой восходящей ветвью (экз. ПИН, № 5644/750), с I_1-I_2 и C_1-M_3 (экз. ПИН, № 5644/751), с P_4-M_3 (экз. ПИН, № 5644/752), с M_3 (экз. ПИН, № 5644/753), без зубов (экз. ПИН, № 5644/754); два фрагмента нижнечелюстных костей: с M_2-M_3 (экз. ПИН, № 5644/755), без зубов (экз. ПИН, № 5644/756); четыре изолированных зуба: два C^1 (экз. ПИН, №№ 5644/757, 758), P_4 (экз. ПИН, № 5644/759) и M_1 (экз. ПИН, № 5644/760).

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарен Д.О. Гимранову (Институт экологии растений и животных Уральского отделения РАН, Екатеринбург) и А.В. Лаврову (ПИН) за сборы материалов в пещере Таврида, С.В. Багирову и Р.А. Ракитову (ПИН) — за помощь в подготовке фотографий, В.С. Лебедеву (Зоологический музей Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, ЗМ МГУ) — за предоставленные для сравнительного изучения материалы по современным рукокрылым из коллекции ЗМ МГУ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00214, <https://rscf.ru/project/22-14-00214/>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лопатин А.В. Раннеплейстоценовый подковонос *Rhinolophus macrorhinus cimmerius* subsp. nov. (Rhinolophidae, Chiroptera) из пещеры Таврида в Крыму // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2022. Т. 506. С. 396–405.
2. 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.
3. Лопатин А.В., Тесаков А.С. Раннеплейстоценовая белозубка *Crociodura kornfeldi* (Lipotyphla, Soricidae) из Крыма // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2021. Т. 501. № 1. С. 499–504.
4. Gunnell G.F., Eiting T.P., Geraads D. New late Pliocene bats (Chiroptera) from Ahl al Oughlam, Morocco // Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie. Abhandlungen. 2011. V. 260. № 1. P. 55–71.
5. Kormos T. Az 1913. évből vett ásatásaim eredményei // A Magyar Királyi Földtani Intézet 1913. évi jelentése. Budapest, 1914. P. 498–505.
6. Kormos T. Diagnosen neuer Säugetiere aus der Oberpliozänen Fauna des Somlyóberges bei Püspökfürdő // Annales Musei Nationalis Hungarici. 1930. V. 27. P. 237–246.
7. Topál G. Bats from the Lowermost Pleistocene Locality 15 at Beremend, Hungary (Mammalia, Chiroptera) // Fragmenta Mineralogica et Palaeontologica. 1985. V. 12. P. 51–57.
8. Ito K., Tu V.T., Eiting T.P., et al. On the embryonic development of the nasal turbinates and their homology in bats // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2021. V. 9. Art. 613545. P. 1–19.
9. Christian J.J. The natural history of a summer aggregation of the big brown bat, *Eptesicus fuscus fuscus* // American Midland Naturalist. 1956. V. 55. № 1. P. 66–95.
10. Gol'din P., Godlevska L., Ghazali M. Age-related changes in the teeth of two bat species: dental wear, pulp cavity // Acta Chiropterologica. 2018. V. 20. № 2. P. 519–530.
11. Rosina V.V., Sinita M.V. Bats (Chiroptera, Mammalia) from the Turolian of the Ukraine: phylogenetic and biostratigraphic considerations // Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie. Abhandlungen. 2014. V. 272. № 2. P. 147–166.
12. Barti L. Istoricul cercetărilor chiropterologice de pe teritoriul României contemporane și baza datelor faunistice de la începuturi până în 1944 // Nymphaea. Folia naturae Bihariae. 2005. V. 32. P. 53–114.
13. Pálffy J., Dulai A., Gasparik M., et al. Catalogue of invertebrate and vertebrate paleontological type specimens of the Hungarian Natural History Museum. Budapest: Hungarian Natural History Museum, 2008.
14. Kretzoi M. Die Nager und Lagomorphen von Voigtstedt in Thüringen und ihre chronologische Aussage // Paläontologische Abhandlungen. Abteilung A. 1965. V. 2. № 2–3. P. 585–661.
15. Rabeder G. Weitere Grabungsergebnisse von der altpleistozänen Wirbeltierfundstelle Deutsch-Altenburg 2 // Die Hohle. 1973. V. 24. № 1–4. P. 8–15.
16. Storch G. Quartäre Fledermaus-Faunen von der Insel Malta // Senckenbergiana Lethaea. 1974. V. 55. P. 407–434.
17. Tata C., Kotsakis T. Italian fossil chiropteran assemblages: a preliminary report // Geo.Alp. 2005. V. 2. P. 53–60.
18. Sevilla García P. Estudio paleontológico de los Quirópteros del Cuaternario español // Paleontologia i Evolució. 1988. V. 22. P. 113–233.
19. Wołoszyn B.W. Pliocene and Pleistocene bats of Poland // Acta Palaeontologica Polonica. 1987. V. 32. № 3–4. P. 207–325.
20. Pereswiet-Soltan A. First record of serotine bat *Eptesicus serotinus* (Chiroptera: Vespertilionidae) from Early-Middle Holocene in southern Europe (Boeotia – Greece) // Hystrix. Italian Journal of Mammalogy. 2016. V. 27. № 2. P. 209–211.

EARLY PLEISTOCENE SEROTINE BAT *EPTESICUS PRAEGLACIALIS* (VESPERTILIONIDAE, CHIROPTERA) FROM THE TAURIDA CAVE IN CRIMEA

Academician of the RAS A. V. Lopatin^{a, #}

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

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

The cranial and mandibular remains of a large serotine bat *Eptesicus praeglacialis* Kormos, 1930 are described from the Lower Pleistocene deposits of the Taurida cave in the central Crimea. This is the first finding of the skull material of *E. praeglacialis* and the first record of the species in Crimea. Judging by the tooth wear stages, the remains of both young and adult specimens are present in the taphocenosis. The small mammal tooth marks on the bones (caused by eating the remnants of soft tissues) in the absence of signs of digestion, characterizing materials from the predatory bird pellets, indicate that the taphocenosis includes the remains of *E. praeglacialis* individuals that used the cave as a shelter and died there. This corresponds to the idea of appearance of hibernation in caves as a climatically determined ecological adaptation in some European forest-dwelling bats (including *Eptesicus*) at the Pliocene–Pleistocene transition.

Keywords: *Eptesicus praeglacialis*, bats, Pleistocene, Crimea, cranial morphology, tooth wear, age-related variability, tooth marks, hibernation