

ISSN 2686-7389

Том 515

Март – Апрель 2024



ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 515, 2024

- Жирнокислотный состав молоди арктического гольца (*Salvelinus alpinus* complex) из естественных экосистем и аквакультуры
А. Е. Рудченко, В. А. Карпов, Н. Н. Суцник, Л. А. Глущенко, М. И. Гладышев 5
- Тестирование эффективности противоопухолевых препаратов на органоидах рака предстательной железы
М. О. Силкина, А. В. Разумовская, С. В. Никулин, А. Г. Тоневицкий, Б. Я. Алексеев 10
- Абerrантная репарация 8-оксогуанина в коротких выпетливаниях ДНК
Д. А. Ерошенко, Е. А. Дятлова, В. М. Гольшев, А. В. Ендуткин, Д. О. Жарков 14
- Комбинация мутаций генов *otu* и *Rif^r* позволяет анализировать сателлитную ДНК в политенных хромосомах герминальных клеток яичников *Drosophila melanogaster*
Т. Д. Колесникова, А. Р. Нохова, А. С. Шацких, М. С. Кленов, И. Ф. Жимулев 19
- Количественное описание деградации N-белка вируса SARS-CoV-2 в клетках, стабильно его экспрессирующих, под действием новых модульных нанотранспортеров
Ю. В. Храмов, А. В. Уласов, Т. Н. Лупанова, Г. П. Георгиев, А. С. Соболев 25
- Влияние модификаторов структуры хроматина на транс-действующий гетерохроматиновый эффект положения у *Drosophila melanogaster*
А. А. Солодовников, С. А. Лавров, А. С. Шацких, В. А. Гвоздев 29
- мРНК *PRPF19* кодирует малую открытую рамку считывания, которая важна для жизнеспособности клеток человека
Н. М. Шепелев, А. О. Курочкина, О. А. Донцова, М. П. Рубцова 37
- Модульные нанотранспортеры, способные вызывать внутриклеточную деградацию N-белка вируса SARS-CoV-2 в клетках A549 с временной экспрессией этого белка, слитого с флуоресцентным белком *mRuby3*
Ю. В. Храмов, А. В. Уласов, Т. Н. Лупанова 45
- Гидрогели на основе рекомбинантного спидроина стимулируют пролиферацию и миграцию клеток роговицы человека
О. И. Агапова, Д. С. Островский, М. Х. Хубецова, Т. З. Керимов, С. А. Борзенок, В. Г. Богуш, Л. И. Давыдова, С. Э. Чеперегин, А. Е. Ефимов, И. И. Агапов, В. Г. Дебабов 49
- Сенсорные структуры карапакса самцов Tantulocarida (Crustacea) не гомологичны решетчатым органам Thecostraca
А. С. Савченко, Г. А. Колбасов 55
- Nemertodermatida* – эндосимбионты кишечника глубоководных кишечнодышащих (*Hemichordata, Torquaratoridae*)
О. В. Ежова, А. И. Лукиных, В. В. Малахов 60
- Модуль RRE-REV не оказывает влияния на эффективность упаковки белков cas9 и Gag в вирусоподобные частицы системы Nanomedic
Н. А. Круглова, Д. С. Комков, Д. В. Мазуров, М. В. Шепелев 64

Функциональная активность системы крови двух мигрирующих видов рукокрылых Урала <i>Л. А. Ковальчук, В. А. Мищенко, Л. В. Черная, В. П. Снитыко, В.Н. Большаков</i>	71
Идентификация ультраструктурных деталей систем отростков астроцитов в нервной ткани головного мозга с использованием коррелятивной сканирующей зондовой и просвечивающей электронной микроскопии <i>О. И. Агапова, А. Е. Ефимов, Е. А. Образцова, К. Е. Мочалов, Д. О. Соловьева, В. А. Олейников, И. И. Агапов, С. В. Готье</i>	76
Обработка семян салициловой кислотой усиливает экспрессию генов и активность антиоксидантных ферментов в растениях пшеницы при дефиците цинка или меди <i>Н. М. Казнина, Н. С. Репкина, Ю. В. Батова, А. А. Игнатенко, А. Ф. Титов</i>	81
Исследование ассоциации белков <i>ouib</i> и <i>nom</i> с гетерохроматином у <i>Drosophila Melanogaster</i> <i>Ю. В. Пекина, В. А. Бабоша, П. Г. Георгиев, А. А. Федотова</i>	87
Уровень противовирусных антител к белку EBNA-1 в сыворотке крови пациентов с рассеянным склерозом не зависит от тяжести заболевания <i>Л. А. Овчинникова, С. С. Джелад, Т. О. Симанов, М. Н. Захарова, А. Г. Габибов, Я. А. Ломакин</i>	92
Противоопухолевое действие высоких доз ионов углерода и рентгеновского излучения при облучении клеток асцитной карциномы Эрлиха <i>ex vivo</i> <i>В. Е. Балакин, Т. А. Белякова, О. М. Розанова, Е. Н. Смирнова, Н. С. Стрельникова, Е. А. Кузнецова</i>	97
Экспериментальное и модельное исследование закрученного течения жидкости в сходящемся канале в качестве модели движения крови в сердце и аорте <i>Я. Е. Жарков, Ш. Т. Жоржوليани, А. А. Сергеев, А. В. Агафонов, А. Ю. Городков, Л. А. Бокерия</i>	104
Новые данные по экологии ископаемого донского зайца (<i>Lepus tanaiticus</i> [Gureev, 1964]) <i>М. Р. Павлова, Г. Г. Боескоров, М. Ю. Чепрасов, Г. П. Новгородов</i>	122
Необычно крупные восточные длиннокрылы, <i>Miniopterus Fuliginosus</i> – смещение признаков или результат гибридизации? <i>С. В. Крусков, С. С. Жукова</i>	128

CONTENTS

Vol 515, 2024

Fatty acid profile of juvenile arctic char (*Salvelinus alpinus* complex) from natural ecosystems and aquaculture

A. E. Rudchenko, V. A. Karpov, N. N. Sushchik, L. A. Glushchenko, M. I. Gladyshev 5

Assessing the efficacy of anti-cancer drugs on organoid models derived from prostate cancer

M. O. Silkina, A. V. Razumovskaya, S. V. Nikulin, A. G. Tonevitsky, B. Ya. Alekseev 10

Aberrant repair of 8-oxoguanine in short DNA bulges

D. A. Eroshenko, E. A. Diatlova, V. M. Golyshev, A. V. Endutkin, D. O. Zharkov 14

Otu and *Rif^r* double mutant enables analysis of satellite DNA in polytene chromosomes of ovarian germ cells in *Drosophila melanogaster*

T. D. Kolesnikova, A. R. Nokhova, A. S. Shatskikh, M. S. Klenov, I. F. Zhimulev 19

Quantitative description of the N-protein of the SARS-CoV-2 virus degradation in cells stably expressing it under the influence of new modular nanotransporters

Y. V. Khramtsov, A. V. Ulasova, T. N. Lupanova, G. P. Georgiev, A. S. Sobolev 25

Effect of chromatin structure modifiers on the trans-acting heterochromatin position effect in *Drosophila melanogaster*

A. A. Solodovnikov, S. A. Lavrov, A. S. Shatskikh, V. A. Gvozdev 29

PRPF19 mRNA encodes a small open reading frame that is important for viability of human cells

N. M. Shepelev, A. O. Kurochkina, O. A. Dontsova, M. P. Rubtsova 37

Modular nanotransporters capable of cause intracellular degradation of the N-protein of the SARS-CoV-2 virus in A549 cells with temporary expression of this protein fused with the fluorescent protein *mRuby3*

Y. V. Khramtsov, A. V. Ulasov, T. N. Lupanova, G. P. Georgiev, A. S. Sobolev 45

Hydrogels based on recombinant spidroin stimulate proliferation and migration of human cornea cells

O. I. Agapova, D. S. Ostrovsky, M. Kh. Khubetsova, T. Z. Kerimov, S. A. Borzenok, V. G. Bogush, L. I. Davydova, S. E. Cheperegin, A. E. Efimov, I. I. Agapov, V. G. Debabov 49

The sensory structures of the carapace of male *Tantulocarida* are not homologous to the lattice organs of Thecostraca

A. S. Savchenkoa, G. A. Kolbasov 55

Nemertodermatid endosymbionts of deep-sea acorn worms (*Hemichordata, Torquaratoridae*)

A. I. Lukinykh, O. V. Ezhova, V. V. Malakhov 60

The RRE-REV module has no effect on the packaging efficiency of cas9 and Gag proteins into nanomedic virus-like particles

N. A. Kruglova, D. S. Komkov, D. V. Mazurov, M. V. Shepelev 64

Functional activity of the blood system of two migratory species of the Ural <i>L. A. Kovalchuk, V. A. Mishchenko, L. V. Chernaya, V. P. Snit'ko, V. N. Bolshakov</i>	71
Identification of ultrastructural details of the astrocyte process system in neural tissue of the brain using correlative scanning probe and transmission electron microscopy <i>O. I. Agapova, A. E. Efimov, E. A. Obraztsova, K. E. Mochalov, D. O. Solovyeva, V. A. Oleinikov, I. I. Agapov, S. V. Gautier</i>	76
Seeds treatment with salicylic acid increases gene expression and activity of antioxidant enzymes in wheat plants under zinc or copper deficiency <i>N. M. Kaznina, N. S. Repkina, Yu. V. Batova, A. A. Ignatenko, A. F. Titov</i>	81
Study of the association of <i>ouib</i> and <i>nom</i> with heterochromatin in <i>Drosophila melanogaster</i> <i>Y. V. Pekina, V. A. Babosha, P. G. Georgiev, A. A. Fedotova</i>	87
The level of anti-viral antigen-specific antibodies to EBNA-1 in the serum of ms patients does not depend on the severity of the disease <i>L. A. Ovchinnikova, S. S. Dzhelad, T. O. Simaniv, M. N. Zakharova, A. G. Gabibov, Y. A. Lomakin</i>	92
Anti-tumor effect of high doses of carbon ions and x-rays during irradiation of Ehrlich ascites carcinoma cells ex vivo <i>V. E. Balakin, T. A. Belyakova, O. M. Rozanova, E. N. Smirnova, N. S. Strelnikova, E. A. Kuznetsova</i>	97
Experimental and model study of swirling fluid flow in a converging channel as a simulation of blood flow in the heart and aorta <i>Ya. E. Zharkov, Sh. T. Zhorzholiani, A. A. Sergeev, A. V. Agafonov, A. Y. Gorodkov, L. A. Bockeria</i>	104
New data on the ecology of the fossil don hare (<i>Lepus tanaiticus</i> [Gureev, 1964]) <i>M. R. Pavlova, G. G. Boeskorov, M. Yu. Cheprasov, G. P. Novgorodov</i>	122
Are abnormally large eastern bent-wing bats, <i>Miniopterus Fuliginosus</i> represent feature shift or result of hybridisation? <i>S. V. Kruskop, S. S. Zhukova</i>	128

УДК 577.1:597.552.5

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ МОЛОДИ АРКТИЧЕСКОГО ГОЛЬЦА (*SALVELINUS ALPINUS* COMPLEX) ИЗ ЕСТЕСТВЕННЫХ ЭКОСИСТЕМ И АКВАКУЛЬТУРЫ

© 2024 г. А. Е. Рудченко^{1,2,*}, В. А. Карпов¹, член-корреспондент РАН Н. Н. Сущик^{1,2}, Л. А. Глущенко¹, член-корреспондент РАН М. И. Гладышев^{1,2}

Поступило 13.11.2023 г.

После доработки 23.11.2023 г.

Принято к публикации 24.11.2023 г.

Установлены значительные отличия жирнокислотного состава мышечной ткани молоди арктического гольца *Salvelinus alpinus* [Linnaeus, 1758] из естественной среды обитания (оз. Собачье) и аквакультуры, а также молоди проходной формы гольца (мальмы) *Salvelinus malma* [Walbaum, 1792] из р. Авача. Выявленные отличия между аквакультурной и дикой молодью гольца были связаны с разными источниками пищи. Для мышечной ткани молоди гольцов из естественной среды обитания были характерны значительно более высокие уровни жирных кислот – биомаркеров диатомовых водорослей, а также биомаркеров морских copepod у проходной формы. У молоди гольцов из аквакультуры были выявлены достоверно более высокие уровни линолевой кислоты, а также длинноцепочечных мононенасыщенных кислот, источником которых могли быть аквакультурные корма. Выявленные различия в питании молоди аквакультурных и диких гольцов не оказали влияния на содержание в мышечной ткани биохимически ценных омега-3-полиненасыщенных жирных кислот: содержание эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот у молоди из естественных экосистем и аквакультуры было близким.

Ключевые слова: арктический голец, молодь рыб, биомаркерные жирные кислоты, жирнокислотный состав, аквакультура.

DOI: 10.31857/S2686738924020014, **EDN:** WGBPJA

Рыбные ресурсы – как морские, так и пресноводные виды рыб – считаются одним из основных источников омега-3-полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) для человека [1]. Ранее нами были обнаружены виды и формы пресноводных рыб с высоким содержанием наиболее ценных омега-3 ПНЖК – эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК, 20:5n⁻³) и докозагексаеновой кислоты (ДГК, 22:6n⁻³). Так, установлено, что некоторые формы арктического гольца *Salvelinus alpinus* complex [Linnaeus, 1758] из озер Норило-Пясинской системы содержат в мышечной ткани от 3.5 до 21.1 мг/г ЭПК + ДГК [2]. При этом арктический голец перспективен для введения в товарную аквакультуру из-за достаточно быстрого темпа роста [3].

Одним из важных вопросов при введении вида в аквакультуру является не только получение высокопродуктивных пород, но и сохранение биохимического качества рыбной продукции. Известно, что содержание ЭПК и ДГК в рыбах зависит в первую очередь от филогенетической принадлежности [4]. Рыбы отряда лососеобразных считаются одними из самых ценных видов по содержанию длинноцепочечных омега-3 ПНЖК. Однако при аквакультурном выращивании лососевых рыб одним из важных факторов, влияющих на состав и содержание жирных кислот в их мышечной ткани, являются используемые пищевые ресурсы [5]. В естественных экосистемах высокий генетический потенциал гольцов, обуславливающий значительное содержание в них ЭПК и ДГК, поддерживается кормовой базой, богатой источниками этих ЖК (диатомовые, динофитовые водоросли). При выращивании гольцов в условиях аквакультуры состав и содержание ЖК, вероятно, будет зависеть от состава и качества используемых кормов, а пищевая ценность гольца как источника ЭПК и ДГК может

¹Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

²Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук Федерального исследовательского центра “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”, Красноярск, Россия

*E-mail: arudchenko@sfu-kras.ru

Таблица 1. Содержание жирных кислот (% от суммы ЖК, среднее значение \pm стандартная ошибка) в мышечной ткани молоди арктического гольца (*Salvelinus alpinus*) и мальмы (*Salvelinus malma*) из аквакультуры и естественных экосистем. Величины имели нормальное распределение (согласно критерию Колмогорова – Смирнова). Значения, отмеченные одной буквой, не имели достоверных отличий в дисперсионном анализе по критерию Тьюки. Статистически достоверные значения ($p < 0.05$) приведены жирным шрифтом, n – число проб.

	Аквакультура 1			Аквакультура 2			оз. Собачье			р. Авача			F	p
	n^{10}			n^{10}			n^5			n^5				
	m	\pm	SE	m	\pm	SE	m	\pm	SE	m	\pm	SE		
14:0	1.3	\pm	0.2 ^A	1.3	\pm	0.1 ^A	2.6	\pm	0.4 ^B	3.2	\pm	0.0 ^B	14.9	0.0001
15–17 РЖК	1.0	\pm	0.1 ^A	0.8	\pm	0.1 ^{AB}	1.3	\pm	0.1 ^{AC}	1.1	\pm	0.1 ^{AC}	6.3	0.0049
16:1 n^7	2.6	\pm	0.2 ^A	2.5	\pm	0.1 ^A	6.6	\pm	1.8 ^B	7.1	\pm	0.1 ^B	7.9	0.0018
18:1 n^9	27.3	\pm	2.0 ^A	33.6	\pm	1.5 ^A	15.6	\pm	3.4 ^B	25.4	\pm	1.3 ^A	11.1	0.0003
18:2 n^6	11.0	\pm	0.6 ^A	12.5	\pm	0.7 ^A	2.3	\pm	0.3 ^B	0.7	\pm	0.0 ^B	138.0	0.0000
18:3 n^3	2.5	\pm	0.1 ^A	2.8	\pm	0.1 ^A	4.3	\pm	1.96 ^A	0.3	\pm	0.0 ^B	15.8	0.0001
$\Sigma 20:1$	3.3	\pm	0.3 ^A	2.7	\pm	0.2 ^A	0.9	\pm	0.2 ^B	2.1	\pm	0.2 ^A	22.5	0.0000
20:4 n^6	1.2	\pm	0.2 ^A	1.1	\pm	0.1 ^A	2.3	\pm	0.6 ^B	0.6	\pm	0.1 ^A	5.1	0.0118
20:5 n^3	4.6	\pm	0.7 ^A	2.6	\pm	0.3 ^B	7.9	\pm	1.9 ^C	7.1	\pm	0.1 ^C	5.5	0.0088
$\Sigma 22:1$	1.7	\pm	0.3 ^A	1.2	\pm	0.1 ^A	0.2	\pm	0.0 ^B	1.5	\pm	0.3 ^A	11.2	0.0003
22:5 n^3	1.0	\pm	0.1 ^A	0.7	\pm	0.0 ^A	2.0	\pm	0.3 ^B	2.0	\pm	0.1 ^B	7.9	0.0018
22:6 n^3	15.3	\pm	2.2 ^A	8.1	\pm	1.1 ^B	15.3	\pm	4.1 ^A	16.2	\pm	0.2 ^A	5.9	0.0198
НЖК	20.9	\pm	0.4 ^A	22.8	\pm	0.8 ^A	29.6	\pm	1.6 ^B	27.2	\pm	0.1 ^B	18.1	0.0000
МНЖК	38.8	\pm	2.7 ^A	44.2	\pm	1.6 ^A	29.0	\pm	5.8 ^B	41.9	\pm	0.1 ^A	4.1	0.0247
ПНЖК	40.2	\pm	2.3	33.0	\pm	1.1	41.4	\pm	7.3	30.9	\pm	0.2	1.8	0.1861

Примечание: 15–17 РЖК – жирные кислоты с разветвленной цепью атомов углерода, НЖК – насыщенные жирные кислоты, МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты.

оказаться как ниже, так и выше по сравнению с дикими рыбами.

Целью работы было сравнение жирнокислотного состава мышечной ткани молоди арктического гольца из озера, реки и экспериментальной аквакультуры для выявления различий в биохимической ценности диких и вводимых в аквакультуру рыб. Также проведен поиск ЖК-биомаркеров, которые могут быть использованы для установления происхождения гольцов из естественной среды обитания либо аквакультуры.

Годовики и двухлетки арктического гольца были отобраны из двух аквакультурных хозяйств, которые осуществляют экспериментальное выращивание одной и той же исходной формы. Дикие особи молоди арктического гольца отбирались в оз. Собачье (Норило-Пясинская система, Красноярский край), откуда ранее был получен рыбопосадочный материал для экспериментальной аквакультуры. Кроме того, была отловлена молодь проходной формы гольца (мальмы) *Salvelinus malma* [Walbaum, 1792] из р. Авача (Камчатский край). Возраст особей из природных экосистем составлял от 0+ до 2, и аквакультуры – от 1+ до 3+. Для анализа отбирали мышечную ткань (0.5–1.0 г) со спинной стороны молоди

гольцов. Липиды из тканей экстрагировали методом Фолча с модификациями. Этапы подготовки проб и анализа ЖК методом хромато-масс-спектрометрии были описаны ранее [2]. Расчеты средних значений и стандартных ошибок, дисперсионный анализ и анализ главных компонент выполнены с использованием пакета Statistica 9.0 (StatSoft Inc.).

Анализ главных компонент процентного содержания ЖК от общей суммы в мышечной ткани показал значительные отличия молоди гольцов из естественной среды обитания и аквакультуры (рис. 1). ЖК состав молоди гольцов из двух экспериментальных аквакультур был близок и не имел значительных отличий уровней основных кислот, за исключением ДГК (табл. 1). Мышечная ткань аквакультурной молоди отличалась достоверно более высокими процентами 18:1 n^9 , 18:2 n^6 , и мононенасыщенных ЖК с 20 и 22 атомами углерода ($\Sigma 20:1$ и $\Sigma 22:1$) (см. рис. 1, табл. 1), по сравнению с молодь гольца выросшей в оз. Собачьем. Вероятно, аквакультурный голец получал эти ЖК из корма, содержащего растительные масла, которые богаты 18:1 n^9 и 18:2 n^6 [6–8]. Напротив, мышечная ткань молоди гольца из оз. Собачье отличалась достоверно более высокими уровнями кислот: 14:0, 16:1 n^7 ,

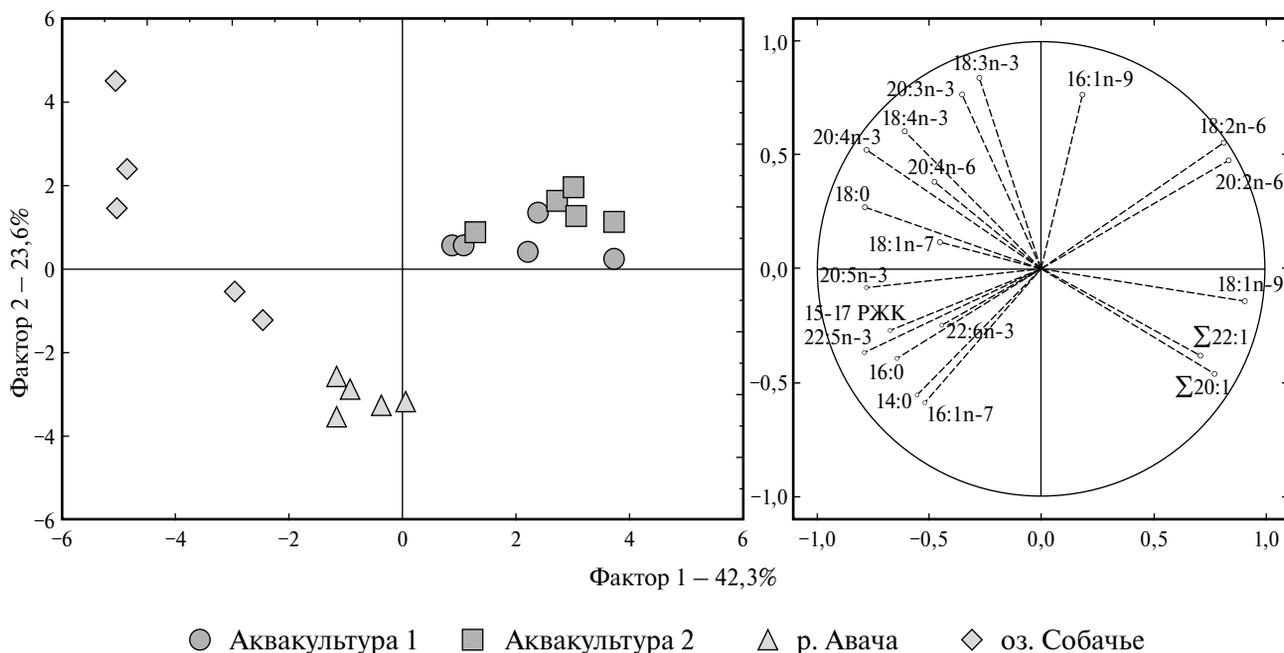


Рис. 1. Анализ главных компонент жирнокислотного состава (% от суммы ЖК) в мышечной ткани молоди арктического гольца (*Salvelinus alpinus*) и мальмы (*Salvelinus malma*) из аквакультуры и естественных экосистем.

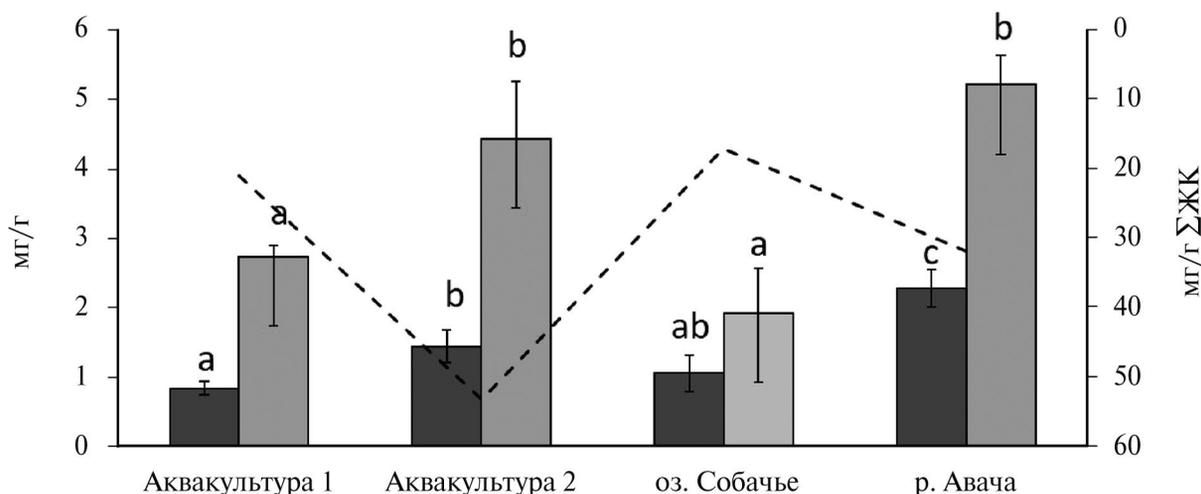


Рис. 2. Содержание эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК), докозагексаеновой кислоты (ДГК) и суммарное содержание жирных кислот (ΣЖК) (мг/г сырой массы) в мышечной ткани молоди арктического гольца (*Salvelinus alpinus*) и мальмы (*Salvelinus malma*) из аквакультуры и естественных экосистем. Значения, отмеченные одной буквой, не имели достоверных отличий в дисперсионном анализе по критерию Тьюки при уровне значимости $p < 0.05$.

и $20:5n^{-3}$ (см. рис. 1, табл. 1). Вероятными источниками этих ЖК являются диатомовые водоросли [9], которые находятся в основе пищевых сетей олиготрофных озер Норило-Пясинской системы. Очевидно, что отличия ЖК состава молоди из оз. Собачье и аквакультуры, посадочный материал которой был получен от особей, обитавших в оз. Собачье, обусловлены различными источниками пищи. Пищевой фактор, вероятно, повлиял и на особенности ЖК состава проходной формы камчатского гольца – мальмы. В мышечной ткани мо-

лоди проходного гольца из р. Авача был отмечен высокий процент кислот $\Sigma 20:1$ и $\Sigma 22:1$ (см. табл. 1). Высоким содержанием этих ЖК отличаются морские копеподы, которые могут накапливаться в дикой молоди гольцов, передаваясь по цепям питания в случае их нагула в устьевой части реки, где возможно присутствие морских копепод. Кроме того, крупная молодь мальмы может поедать икру проходных лососевых рыб [10]. Аквакультурная молодь гольцов получает эти ЖК из кормов, в которые добавляют рыбную муку и биомассу копе-

под морского происхождения, содержащих высокие уровни 20:1 и 22:1 [11]. С другой стороны, так же как у молоди гольца из оз. Собачье, мышечная ткань молоди проходной формы из р. Авача отличалась высокими уровнями: 14:0, 16:1 n^{-7} , и 20:5 n^{-3} (см. табл. 1), происходящими, вероятно, из диатомовых водорослей.

Однако фактор питания, вероятно, не повлиял на содержание ценных омега-3 ПНЖК на единицу массы мышечной ткани исследуемой молоди. Голец из двух аквакультурных хозяйств содержал 3.5 ± 0.3 и 5.5 ± 1.1 мг/г сырой массы ЭПК + ДГК, тогда как голец из оз. Собачье – около 3.0 ± 0.6 мг/г, а проходной голец из р. Авача – 7.5 ± 0.9 мг/г ЭПК+ДГК (рис. 2). Выявленные отличия не всегда были достоверны. Вероятно, содержание ЭПК и ДГК в данном случае не отражало характер питания, а было связано с накоплением общих липидов в мышечной ткани. Подобная тенденция была отмечена для половозрелых гольцов разных форм [2]. Кроме того, полученные данные говорят о высоком, и даже близком ко взрослым особям, содержании у неполовозрелых гольцов ЭПК и ДГК.

Таким образом, биохимическая ценность молоди одной и той же формы арктического гольца из аквакультуры и естественной экосистемы, как источника длинноцепочечных ПНЖК, оказалась близка. На данном этапе онтогенеза аквакультурный голец сохраняет свою высокую пищевую ценность как источник ЭПК и ДГК. Однако по мере роста экспериментального стада арктического гольца в аквакультуре следует оценить состав и содержание ЖК на последующих стадиях и при достижении товарных размеров и половой зрелости.

Кроме того, были установлены отдельные ЖК, уровни которых значительно различались у аквакультурных и диких форм, которые можно использовать в качестве биохимических маркеров при определении происхождения гольцов и их рыбных продуктов. Повышенное содержание таких ЖК, как 14:0, 16:1 n^{-7} и 20:5 n^{-3} , может указывать на происхождение как жилых, так и проходных форм из естественных экосистем, а высокий уровень 18:2 n^{-6} может указывать на аквакультурное происхождение гольцов. Эти данные могут быть использованы при проведении экспертиз или уточнения местообитания при условии дополнительных исследований разнообразных форм и местообитаний арктического гольца.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РНФ (проект № 22-24-20023), Красноярским краевым фондом науки. Организационная поддержка полевых и рыбохозяйственных исследований обеспечена Проектным офисом развития Арктики (ПОРА).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Исследования с животными были одобрены комиссией Комитета по биомедицинской этике Сибирского федерального университета (протокол от 23.01.2022 г. № 1).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не имеют конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tocher D.R.* Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish // *Rev. Fish. Sci.* 2003. V. 11. № 2. P. 107–184.
2. *Gladyshev M.I., Makhrov A.A., Baydarov I.V., et al.* Fatty acid composition and contents of fish of genus *Salvelinus* from natural ecosystems and aquaculture // *Biomolecules.* 2022. V 12 (1). P. 144.
3. *Никандров В.Я., Павлисов А.А., Шиндавина Н.И. и др.* Арктический голец (*Salvelinus alpinus* L.) – перспективный объект для аквакультуры севера России // *Арктика: экология и экономика.* 2018. № 3 (31). С. 137–143.
4. *Vasconi M., Caprino F., Bellagamba F. et al.* Fatty acid composition of freshwater wild fish in subalpine lakes: a comparative study // *Lipids.* 2015. V. 50. № 3. P. 283–302.
5. *Gladyshev M.I., Makhrov A.A., Sushchik N.N., et al.* Differences in composition and fatty acid contents of different rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains in similar and contrasting rearing conditions // *Aquaculture.* 2022. V. 556. P. 738265.
6. *Nasopoulou C., Zabetakis I.* Benefits of fish oil replacement by plant originated oils in compounded fish feeds. A review // *LWT – Food Science and Technology.* 2012. V. 47. P. 217–224.
7. *Teves J.F., Ragaza J.A.* The quest for indigenous aquafeed ingredients: a review // *Reviews in Aquaculture.* 2016. V. 8. P. 154–171.
8. *Гладышев М.И.* Наземные источники полиненасыщенных жирных кислот для аквакультуры // *Вопросы ихтиологии.* 2021. Т. 61, № 4. С. 471–485. [*Gladyshev M.I.* Terrestrial sources of polyunsaturated fatty acids for aquaculture // *Journal of Ichthyology.* 2021. Vol. 61. № 4. P. 632–645.]
9. *Claustre H., Marty J.C., Cassiani L., et al.* Fatty acid dynamics in phytoplankton and microzooplankton communities during a spring bloom in the coastal Ligurian Sea: ecological implications // *Mar. Micr. Food Webs.* 1989. V. 3. № 2. P. 51–66.
10. *Ярош Н.В., Травина Н.Т.* Питание разновозрастной молоди мальмы *Salvelinus malma* (Walb.) в нижнем течении реки Большая (западная Камчатка) // *Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана.* 2011. Т. 20. № 4. С. 52–55.
11. *Лагуткина Л.Ю.* Перспективное развитие мирового производства кормов для аквакультуры: альтернативные источники сырья // *Вестник АГТУ. Серия: Рыбное хозяйство.* 2017. № 1. С. 67–78.

**FATTY ACID PROFILE OF JUVENILE ARCTIC CHAR
(*SALVELINUS ALPINUS* COMPLEX) FROM
NATURAL ECOSYSTEMS AND AQUACULTURE**

**A. E. Rudchenko^{a, b, #}, V. A. Karpov^a, Corresponding Member of RAS N. N. Sushchik^{a, b},
L. A. Glushchenko^a, Corresponding Member of RAS M. I. Gladyshev^{a, b}**

^a*Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation*

^b*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*

[#]*E-mail: arudchenko@sfu-kras.ru*

Significant differences in the fatty acid composition of the muscle tissue of juvenile Arctic char *Salvelinus alpinus* [Linnaeus, 1758] from the natural habitat (Lake Sobachye) and aquaculture, as well as juveniles of the anadromous form of char (malma) *Salvelinus malma* [Walbaum, 1792] from the Avacha River. The observed differences between aquaculture and wild juvenile char were associated with different food sources. The muscle tissue of juvenile char from natural habitat was characterized by significantly higher levels of fatty acids – biomarkers of diatoms, as well as biomarkers of marine copepods in the anadromous form. In the fatty acid composition of juvenile char from aquaculture, significantly higher levels of linoleic acid were revealed, as well as long-chain monounsaturated acids, the source of which could be aquaculture feed. The identified differences did not have a significant effect on the content of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the muscle tissue of juvenile aquaculture and wild char. The content of biochemically valuable omega 3 polyunsaturated fatty acids in juvenile char from natural ecosystems and aquaculture was similar.

Keywords: arctic char, juvenile fish, biomarker fatty acids, fatty acid composition, aquaculture.

УДК 57.021, 576.08

ТЕСТИРОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОРГАНОИДАХ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2024 г. М. О. Силкина^{1,*}, А. В. Разумовская¹, С. В. Никулин^{1,2},
член-корреспондент РАН А. Г. Тоневицкий¹, Б. Я. Алексеев²

Поступило 01.12.2023 г.

После доработки 05.12.2023 г.

Принято к публикации 05.12.2023 г.

Доказано, что опухолевые органоиды хорошо отражают фенотипические и генетические характеристики исходного биоматериала. Сообщалось, что результаты тестирования лекарственных препаратов на органоидных культурах могут передавать клинический ответ пациентов. В данной работе из биопсийного материала рака предстательной железы (РПЖ) была получена органоидная культура, на которой были протестированы препараты доцетаксел и энзалутамид, применяющиеся в клинической практике для лечения РПЖ. Было проведено сравнение разных способов оценки эффективности препаратов *in vitro*. Было показано, что полуингибирующая концентрация доцетаксела была значительно ниже, чем у энзалутамида. Однако при проведении эксперимента с клинически значимыми концентрациями и временами инкубации энзалутамид демонстрировал более высокую эффективность, чем доцетаксел. Таким образом, для дальнейшего применения в клинической практике важно оптимизировать условия тестирования препаратов на культурах *in vitro*.

Ключевые слова: органоиды, рак предстательной железы, доцетаксел, энзалутамид, лекарственный тест.

DOI: 10.31857/S2686738924020021, EDN: WGAXGU

ВВЕДЕНИЕ

Согласно статистике ежегодно в мире регистрируется более 1.4 миллиона новых случаев рака предстательной железы (РПЖ), с уровнем смертности около 375 тысяч [1]. В 112 странах этот вид рака является наиболее часто диагностируемым среди мужчин [1]. В России РПЖ является вторым по распространенности онкологическим заболеванием среди мужчин и третьим по смертности [2].

Для лечения РПЖ в настоящее время существует несколько подходов и ряд препаратов. Выбор той или иной схемы лечения определяется главным образом уровнем прогрессии заболевания. В первую очередь при выборе стратегии лечения учитываются кастрационная чувствительность или резистентность рака предстательной железы, а также наличие или отсутствие метастазов [3]. Одними из наиболее распространенных препаратов для лечения РПЖ, используемых в клинической практике, являются препараты доцетаксел и энзалутамид. Механизм действия доцетаксела заключается в ингибировании

процесса деления клеток посредством нарушения нормальной функции микротрубочек [4]. Данный препарат используется для лечения не только разных форм РПЖ, но и других видов рака, таких как рак молочной железы, рак желудка и другие [4]. Энзалутамид является антиандрогеном, механизм его действия заключается в блокировании андрогеновых рецепторов, тем самым предотвращается важное действие гормонов, таких как тестостерон и дигидротестостерон, на клетки предстательной железы, в том числе опухолевые [5]. Энзалутамид, как и доцетаксел, демонстрирует эффективность при лечении разных видов РПЖ, таких как метастатический и неметастатический кастрационно-резистентный РПЖ, а также метастатический кастрационно-чувствительный РПЖ [6].

Учитывая разнообразие препаратов, доступных для лечения, а также проблему лекарственной устойчивости, в последнее время все большую популярность приобретают индивидуальные подходы при выборе схемы лечения. В последние годы трехмерные опухолевые органоиды, полученные от пациентов, стали популярными моделями для *in vitro* исследований в области рака [7]. Это стало возможным благодаря тому, что опухолевые органоиды эффективно сохраняют генетические и морфологические особенности исходного биоматериала пациента, позволяют достаточно легко осуществ-

¹Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, Россия

²ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр радиологии” Минздрава России, Москва, Россия

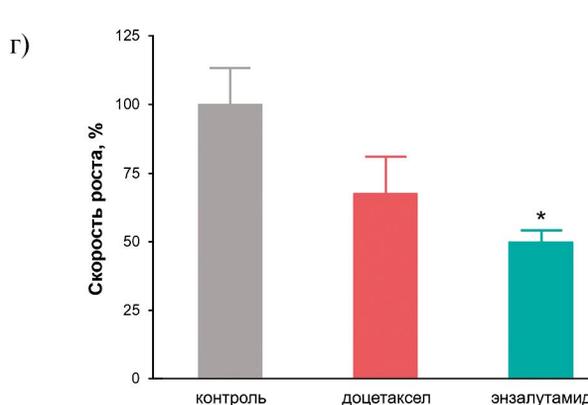
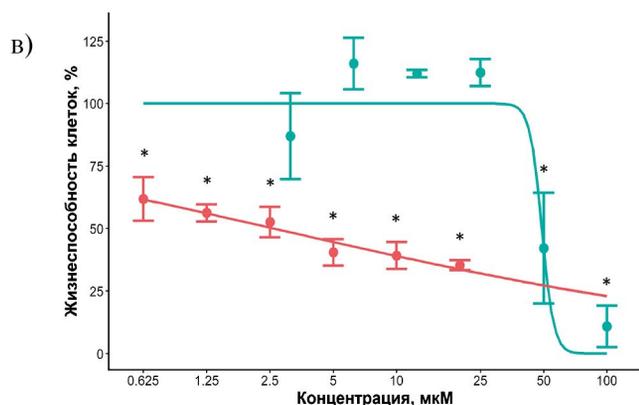
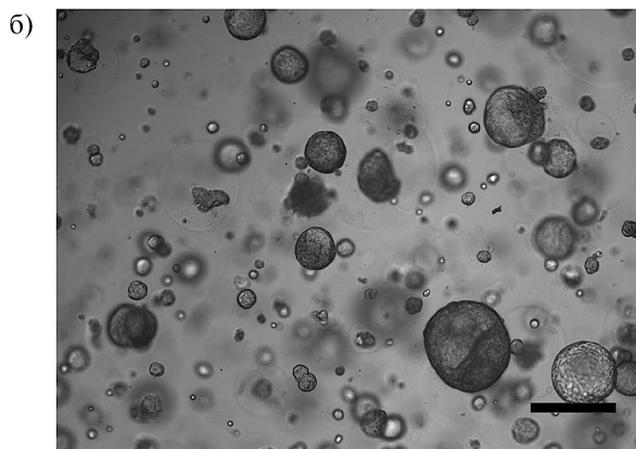
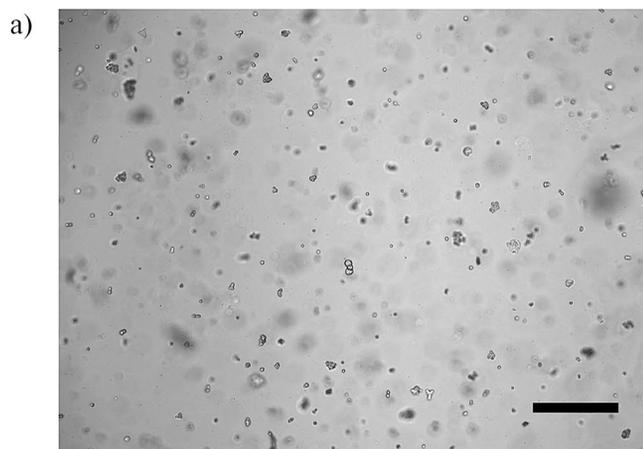
*E-mail: mosilkina@hse.ru

лять скрининг лекарственных препаратов и даже выявлять механизмы их действия [8, 9]. Также было показано, что такие культуры могут успешно использоваться для предсказания реакции пациентов на лекарственные препараты в клинической практике [10]. Все перечисленные особенности делают опухолевые органоиды, полученные от конкретных пациентов, перспективной моделью для исследования чувствительности к определенным препаратам с целью выбора индивидуально адаптированного плана лечения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичную органоидную культуру опухолевых клеток предстательной железы получали из опухолевой ткани по технологии, описанной ранее [11]. Перед проведением цитотоксического теста органоиды обрабатывали диссоциирующим раствором TrypLE Express, ресуспендировали, переносили в пробирку на 1.5 мл, инкубировали в термостате при 37 °C 2–3 мин, после чего добавляли равный объем DPBS, ресуспендировали, центрифугировали при

300 g 4 мин и отбирали надосадочную жидкость. К осадкам добавляли внеклеточный матрикс Matrigel и ресуспендировали клетки. Переносили по 10 мкл суспензии в лунки культурального 96-луночного планшета. Планшет помещали в клеточный инкубатор до застывания геля. После в лунки добавляли по 100 мкл питательной среды и инкубировали планшет в клеточном инкубаторе в течение 24 ч. Для оценки цитотоксического эффекта доцетаксела и энзалутамида была осуществлена титровка препаратами в диапазоне концентраций от 0.625 до 100 мкМ. Клетки после добавления тестируемых препаратов инкубировали в клеточном инкубаторе в течение 72 ч. Для оценки ингибирования скорости роста органоидов в культуральную среду добавляли доцетаксел в концентрации 5.47 мкМ, что соответствует клиническим данным по фармакокинетике [12]. Клетки инкубировались с препаратом в течение 3 ч, после чего происходила смена среды на новую, инкубацию продолжали еще в течение 72 ч. Аналогично энзалутамид добавлялся в концентрации 24.55 мкМ и инкубировался с клет-



Прижизненные микрофотографии культуры органоидов рака предстательной железы в проходящем свете, 2-й пассив сразу после пересадки (а) и через 14 дней после пересадки, отрезок масштаба 400 мкм (б), жизнеспособность органоидов после обработки доцетакселом (красный) и энзалутамидом (голубой) в диапазоне концентраций от 0.625 до 100 мкМ (в) и скорость роста органоидов после обработки доцетакселом и энзалутамидом в клинической концентрации (г), * означает статистическое различие с контролем ($p < 0.05$).

ками в течение 72 ч [13]. Эксперимент проводили в трех повторах. Для оценки жизнеспособности клеток использовали MTS-тест согласно протоколу производителя. Поглощение измеряли при помощи планшетного мультифункционального ридера SpectraMax iD3. Фоновое поглощение измеряли в лунках без клеток. Жизнеспособность рассчитывали по формуле:

$$(A - O) / (A(0) - O) \times 100\% ,$$

где A – поглощение в тестовых лунках после инкубации с препаратом; $A(0)$ – поглощение в контрольных лунках после инкубации с препаратом, O – фоновое поглощение. Скорость роста рассчитывали по формуле:

$$(2^{[\log_2((A - O)/(A_0 - O))]/[\log_2((A(0) - O)/(A_0 - O))]} - 1) \times 100\% ,$$

где A_0 – поглощение в лунках с клетками непосредственно перед добавлением препарата. Для оценки статистической достоверности наблюдаемых отличий использовали дисперсионный анализ (ANOVA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе удалось успешно установить органоидную культуру, полученную из биопсии пациенты с РПЖ. Микрофотографии органоидов представлена на рисунке (*а, б*). Стоит отметить, что получение органоидных культур из опухолевых клеток предстательной железы технически является более сложным, чем для многих других типов рака [14, 15], а культивирование органоидов РПЖ зачастую ограничивается лишь несколькими пассажами [16].

Анализ жизнеспособности полученных органоидных линий при действии противоопухолевых препаратов доцетаксела и энзалутамида позволил определить концентрацию полумаксимального ингибирования (см. рисунок, *в*). Она составила $49.0 \pm \pm 25.8$ мкМ для энзалутамида и 2.6 ± 0.9 мкМ для доцетаксела. Отсюда следует вывод, что при применении стандартной методики оценки эффективности препаратов доцетаксел является более эффективным противоопухолевым агентом. Однако оценка скорости роста органоидных культур при действии препаратов в приближенных к клинике условиях показала, что энзалутамид ингибирует скорость роста опухолевых органоидов более эффективно, чем доцетаксел (см. рисунок, *г*). При этом энзалутамид замедлил скорость роста культуры практически на 50% ($p < 0.05$), в то время как доцетаксел не показал статистически значимого ингибирования. Стоит отметить, что показатель ингибирования роста считается более чувствительной метрикой, поскольку позволяет проводить измерение независимо от таких параметров, как плотность клеток или их ско-

рость роста, что может вносить искажение при измерении жизнеспособности [17].

Таким образом, органоидная культура, полученная от пациента с РПЖ, показала разную чувствительность к противоопухолевым препаратам доцетаксел и энзалутамид. Было выявлено, что доцетаксел демонстрирует практически в 10 раз меньшую концентрацию полумаксимального ингибирования по сравнению с энзалутамидом. Однако для получения релевантных для клиники результатов важно учитывать тот факт, что клиническая концентрация энзалутамида практически в 5 раз выше, чем соответствующая концентрация доцетаксела [12, 13]. Определение более чувствительной метрики, эффективности ингибирования роста, показало, что только энзалутамид в клинической концентрации статистически значимо ингибирует рост опухолевых органоидов. Таким образом, опухолевые органоиды, полученные от пациентов с РПЖ, обладают потенциалом для определения чувствительности конкретного пациента к тому или иному препарату при правильном выборе методики тестирования. Стоит отметить, что в литературе есть малочисленные сообщения о том, что результаты органоидных тестов могут соответствовать ответам пациентов с РПЖ в клинике [18]. Все это делает органоидные модели РПЖ перспективной *in vitro* системой, которая может быть полезной при определении наиболее эффективной противоопухолевой терапии для конкретного пациента.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-15-00397).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом № 488 Московского научно-исследовательского онкологического института им. П. А. Герцена – филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России от 27.03.2020. Пациент подписал информированное согласие на участие в исследовании.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sung, H. Ferlay, J. Siegel R.L., et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2021. V. 71. № 3. P. 209–249.

2. *Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О.* Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность). // Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022.
3. *Grimaldi A.M., Salvatore M., and Cavaliere C.* Diagnostic and prognostic significance of extracellular vesicles in prostate cancer drug resistance: A systematic review of the literature. // *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. 2023. Vol. 26. № 2. P. 228–239.
4. *Montero A., Fossella F., Hortobagyi G., et al.* Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. // *The Lancet Oncology*. 2005. Vol. 6. № 4. P. 229–239.
5. *Scott L.J.* Enzalutamide: A Review in Castration-Resistant Prostate Cancer. // *Drugs*. 2018. Vol. 78. № 18. P. 1913–1924.
6. *Armstrong A.J., Szmulewitz R.Z., Petrylak D.P., et al.* ARCHES: A Randomized, Phase III Study of Androgen Deprivation Therapy With Enzalutamide or Placebo in Men With Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. // *Journal of Clinical Oncology*. 2019. Vol. 37. № 32. P. 2974–2986.
7. *Jackson S.E., Chester J.D.* Personalised cancer medicine. // *International Journal of Cancer*. 2015. Vol. 137. № 2. P. 262–266.
8. *Nikulin S.V., Alekseev B.Y., Sergeeva N.S., et al.* Breast cancer organoid model allowed to reveal potentially beneficial combinations of 3,3'-diindolylmethane and chemotherapy drugs // *Biochimie*. 2020. Vol. 179. P. 217–227.
9. *Poloznikov A.N., Nikulin S.V., Bolotina L.V., et al.* 9-ING-41, a Small Molecule Inhibitor of GSK-3 β , Potentiates the Effects of Chemotherapy on Colorectal Cancer Cells. // *Frontiers in Pharmacology*. 2021. Vol. 12. P. 1–18.
10. *Verduin M., Hoeben A., De Ruyscher D., et al.* Patient-Derived Cancer Organoids as Predictors of Treatment Response // *Frontiers in Oncology*. 2021. Vol. 11. P. 6491980.
11. *Nikulin S. V., Alekseev B. Y., Poloznikov A. A., et al.* The first experience of using prostate cancer organoids as a model for personalized selection of drugs. // *Cancer Urology*. 2023. Vol. 19, № 2. P. 41–46.
12. *Liston D.R., Davis M.* Clinically Relevant Concentrations of Anticancer Drugs: A Guide for Nonclinical Studies. // *Clinical Cancer Research*. 2017. Vol. 23. № 14. P. 3489–3498.
13. *Gibbons J.A., Ouatas T., Krauwinkel W., et al.* Clinical Pharmacokinetic Studies of Enzalutamide. // *Clinical Pharmacokinetics*. 2015. Vol. 54. № 10. P. 1043–1055.
14. *Xu H., Jiao D., Liu A., et al.* Tumor organoids: applications in cancer modeling and potentials in precision medicine. // *Journal of Hematology & Oncology*. 2022. Vol. 15. № 1. P. 58.
15. *Beshiri M., Agarwal S., Yin J.J., et al.* Prostate organoids: emerging experimental tools for translational research. // *Journal of Clinical Investigation*. 2023. Vol. 133. № 10. P. 169616.
16. *Laccetti A. L., Morris M. J., Kantoff P. W.* A Clinical Evaluation of Enzalutamide in Metastatic Castration-Sensitive Prostate Cancer: Guiding Principles for Treatment Selection and Perspectives on Research. // *Oncotargets and Therapy*. 2020. Vol. Volume 13. P. 13247–13263.
17. *Hafner M., Niepel M., Chung M., et al.* Growth rate inhibition metrics correct for confounders in measuring sensitivity to cancer drugs. // *Nature Methods*. 2016. Vol. 13. № 6. P. 521–527.
18. *Karkampouna S., La Manna F., Benjak A., et al.* Patient-derived xenografts and organoids model therapy response in prostate cancer. // *Nature Communications*. 2021. Vol. 12. № 1. P. 1117.

ASSESSING THE EFFICACY OF ANTI-CANCER DRUGS ON ORGANOID MODELS DERIVED FROM PROSTATE CANCER

**M. O. Silkina^{a, #}, A. V. Razumovskaya^a, S. V. Nikulin^{a, b},
Corresponding Member of the RAS A. G. Tonevitsky^a, B. Ya. Alekseev^b**

^a National Research University “Higher School of Economics”, Moscow, Russian Federation

^b National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russian Federation

[#] E-mail: mosilkina@hse.ru

It has been proven that tumor organoids effectively mirror the phenotypic and genetic traits of the original biomaterial. It has been noted that outcomes from drug testing in organoid cultures can accurately represent the clinical response observed in patients. In this study, an organoid culture was derived from biopsy material of prostate cancer (PC). Subsequently, clinical practice drugs, docetaxel and enzalutamide, were tested on this organoid culture. Various techniques for evaluating the efficacy of drugs in vitro were compared. The half maximal inhibitory concentration of docetaxel was found to be markedly lower compared to that of enzalutamide. However, when tested at clinically relevant concentrations and incubation times, enzalutamide was more effective than docetaxel. Therefore, it is crucial to optimize the testing conditions for drugs on in vitro cultures for their subsequent application in clinical practice.

Keywords: organoids, prostate cancer, docetaxel, enzalutamide, drug test.

УДК 577.151.4

АБЕРРАНТНАЯ РЕПАРАЦИЯ 8-ОКСОГУАНИНА В КОРОТКИХ ВЫПЕТЛИВАНИЯХ ДНК

© 2024 г. Д. А. Ерошенко^{1, 2}, Е. А. Дятлова¹, В. М. Гольшев¹, А. В. Ендуткин¹,
член-корреспондент РАН Д. О. Жарков^{1, 2, *}

Поступило 20.11.2023 г.

После доработки 25.11.2023 г.

Принято к публикации 25.11.2023 г.

Присутствие повреждений в ДНК может увеличить частоту ошибок репликации ДНК и значительно повысить количество мутаций. В частности, паузы ДНК-полимераз в месте повреждения могут приводить к проскальзыванию полимеразы и образованию коротких выпетливаний длиной 1–2 нуклеотида. Репарация таких структур по неповрежденной ДНК-матрице ведет к микроделециям. Для одного из наиболее часто встречаемых окислительных повреждений ДНК, 8-оксогуанина (охоG), показано образование микроделений по неизвестному на данный момент механизму. В работе изучена аберрантная репарация охроG, находящегося в одно- и двухнуклеотидных выпетливаниях, системами эксцизионной репарации оснований ДНК *Escherichia coli* и человека. Показано, что репарация в таких субстратах может служить механизмом фиксации микроделений у бактерий, но не у человека.

Ключевые слова: повреждение ДНК, мутагенез, репарация ДНК, ДНК-гликозилазы, 8-оксогуанин, Fpg, OGG1.

DOI: 10.31857/S2686738924020031, **EDN:** WGASGM

Ошибки ДНК-полимераз во время репликации могут приводить к образованию коротких выпетливаний длиной 1–2 нуклеотида в матричной или дочерней цепи ДНК. Неспаренные основания в них могут принимать как внутри-, так и внеспиральную конформацию [1–3] в зависимости от условий и нуклеотидного окружения. Такие структуры инициируют мутации со сдвигом рамки считывания – микроинсерции и микроделеции. Основной путь образования коротких выпетливаний – это проскальзывание ДНК-полимераз, что зачастую вызвано временными остановками фермента при наличии в ДНК повреждений [4]. Если ДНК-полимераза, сделав паузу в месте повреждения, включает dNMP, комплементарный первому или второму следующему по ходу нуклеотиду матрицы, возникает выпетливание. Если впоследствии оно удаляется системами репарации ДНК, происходит микроделеция (рис. 1а). Подобные события «аберрантной репарации», закрепляющие мутации, вносят заметный вклад в общую геномную нестабильность [5].

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

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

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

В число самых распространенных повреждений ДНК входит 8-оксогуанин (охоG, рис. 1б) [6]. Он представляет собой предмутагенное повреждение, поскольку при репликации способен образовывать хугстенговскую пару охроG:A. Однако спектр мутаций, вызванных охроG, этим не ограничивается; среди продуктов репликации в клетках *E. coli* и человека наблюдается заметное число микроделений в месте охроG, что говорит об образовании выпетливаний при попытке ДНК-полимераз пройти повреждение [7–9].

ОхроG удаляется из ДНК по пути эксцизионной репарации оснований, который инициируется ДНК-гликозилазами Fpg (у бактерий) и OGG1 (у эукариот). Эти ферменты негомологичны и имеют совершенно разную третичную структуру. Тем не менее их субстратная специфичность практически идентична: оба они гидролизуют N-гликозидную связь охроG в парах охроG:C. Далее продукт реакции подвергается последовательно действию апурин-апиримидиновой эндонуклеазы (Xth или Nfo у *E. coli*, APE1 у человека), ДНК-полимеразы (ДНК-полимераза I у *E. coli*, ДНК-полимераза β у человека) и ДНК-лигазы, что восстанавливает целостность ДНК.

Несмотря на то что репарация охроG изучена достаточно подробно, до сих пор практически не

Таблица 1. Кинетические и термодинамические параметры реакций расщепления ДНК-субстратов ферментами Fpg и OGG1

Субстрат	$T_{пл}, ^\circ\text{C}$	Фермент						
		Fpg				OGG1		
		$K_M, \text{нМ}$	$k_{cat}, \text{мин}^{-1}$	$k_{cat}/K_M, \text{нМ}^{-1} \text{мин}^{-1}, \times 10^2$	$K_d, \text{нМ}$	$k_2, \text{мин}^{-1}$	$k_3, \text{мин}^{-1}, \times 10^4$	$K_d, \text{нМ}$
X.0	70.7	35 ± 7	14 ± 1	41 ± 10	7.3 ± 1.6	22 ± 2	210 ± 60	94 ± 29
X.1	60.7	23 ± 8	11 ± 1	49 ± 22	6.7 ± 2.2	0.27 ± 0.03	–	54 ± 16
X.2.1	59.9	190 ± 50	4.3 ± 0.4	2.2 ± 0.7	24 ± 10	0.22 ± 0.09	–	420 ± 110
X.2.2	55.6	96 ± 32	2.6 ± 0.5	2.7 ± 1.5	11 ± 4	0.61 ± 0.12	–	230 ± 70

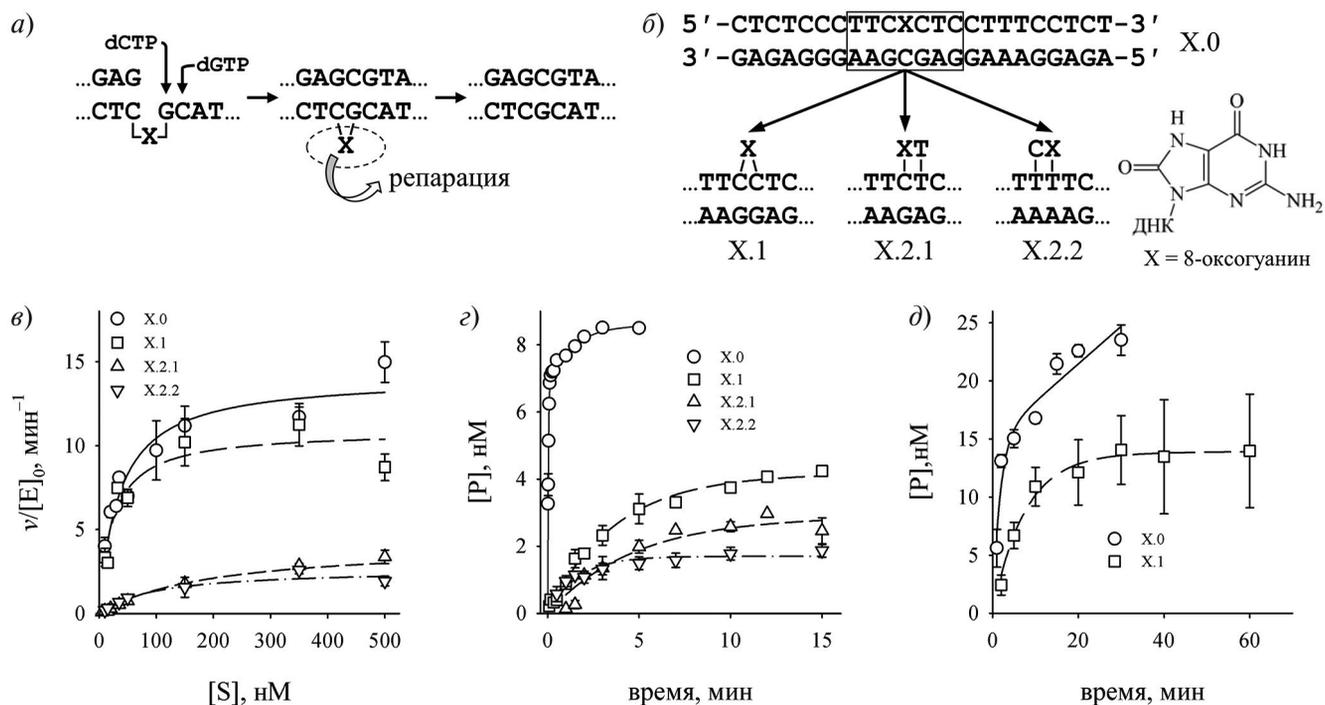


Рис. 1. Схема образования микроделений при проскальзывании ДНК-полимеразы (а); схема строения использованных в работе ДНК-субстратов (б); графики зависимости начальной скорости реакции от исходной концентрации субстрата $[S]$ для фермента Fpg (4.2 нМ) (условия реакции: 25 мМ Трис–НСl pH 7.5, 50 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 37 °С) (в); кинетические кривые расщепления субстратов ферментом OGG1 в том же буфере при $[E]_0 = 5 \text{ мкМ}$, $[S]_0 = 20 \text{ нМ}$ (г) и $[E]_0 = 10 \text{ нМ}$, $[S]_0 = 100 \text{ нМ}$ (д). Для субстратов X.2.1 и X.2.2 расщепления в (д) не наблюдалось. После реакции с OGG1 смеси прогревали со 100 мМ NaOH (5 мин, 95 °С). Во всех случаях продукты реакции разделяли электрофорезом в 20%-ном полиакриламидном геле в присутствии 7 М мочевины и анализировали с помощью установки радиолюминесцентного сканирования Typhoon 9500 (GE Healthcare). На графиках приведены средние значения и стандартные отклонения по трем независимым экспериментам.

затрагивалась проблема его удаления из неканонических структур ДНК, в частности выпетливаний, что важно для понимания механизмов индукции микроделений этим поврежденным основанием. В настоящей работе изучено удаление охoG из выпетливаний ферментами Fpg и OGG1. Исследуемые субстраты представляют собой олигодезоксирибонуклеотидные дуплексы, в которых напротив охoG расположен C или охoG находится в составе одно- или двухнуклеотидного выпетливания; в последнем случае повреждение располагается в первой или

второй позиции внеспирального участка (рис. 1б). Выпетливания снижали стабильность дуплекса, однако температура плавления всех субстратов оставалась заметно выше 37 °С (табл. 1; $T_{пл}$ измеряли, регистрируя поглощение при 260 нм при помощи спектрофотометра Cary 300-Bio Melt, снабженного термостатным блоком). Цепь, содержащая охoG, была помечена по 5'-концу ^{32}P для экспериментов по связыванию и расщеплению ДНК-субстратов или флуорофором Су3 для экспериментов по реконструкции репарации. Белки Fpg *E. coli*, OGG1,

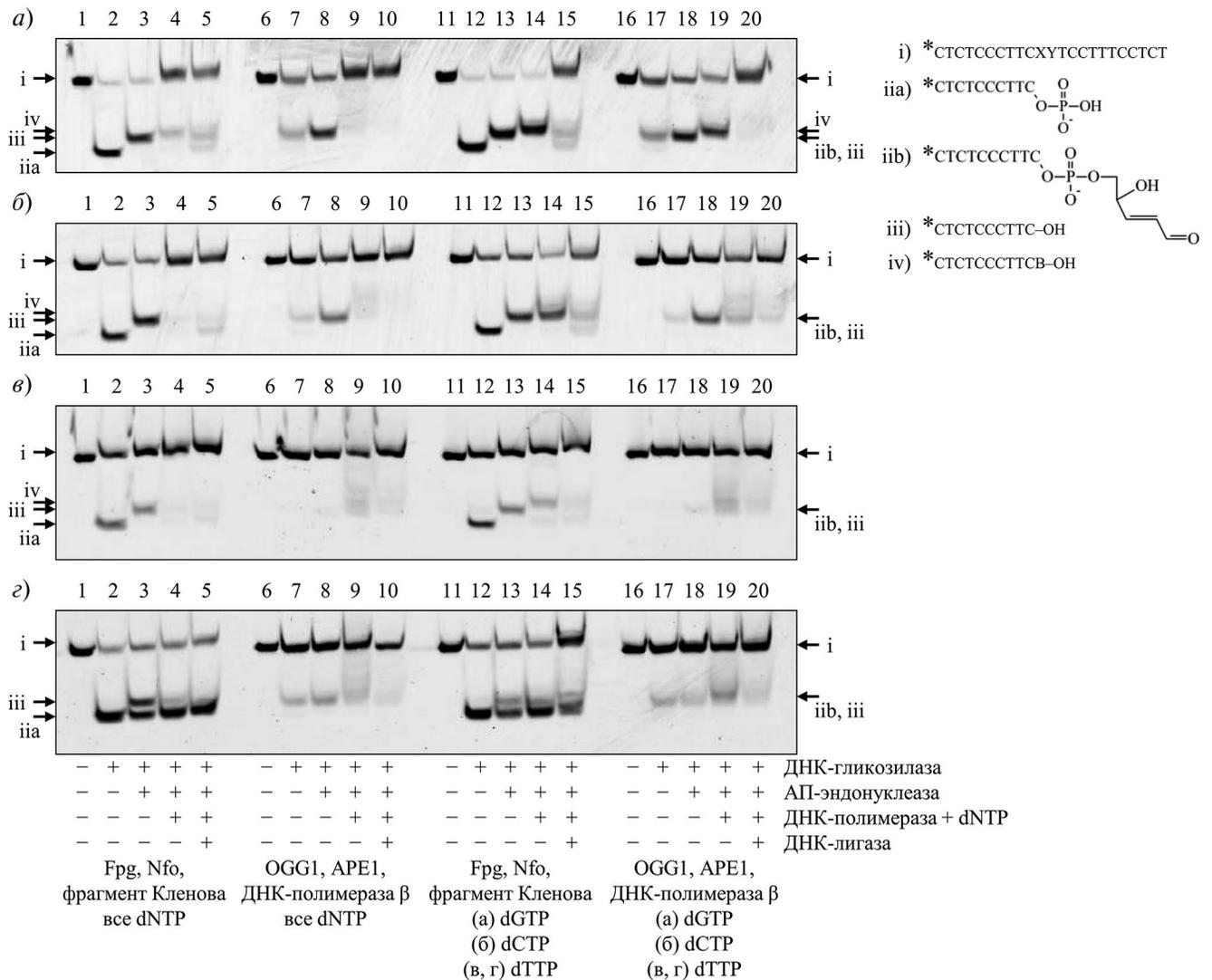


Рис. 2. Репрезентативные флуоресцентные снимки после электрофоретического разделения в денатурирующем 20%-ном полиакриламидном геле продуктов реакции в реконструированной системе репарации субстратов X.0 (a), X.1 (б), X.2.1 (в) и X.2.2 (г). Условия реакции: 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ ДТТ, 1 мМ АТФ, 25 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, 50 нМ ДНК-субстрат, 0.5 ед. акт./мкл ДНК-лигазы, 200 нМ прочие ферменты, 250 мкМ dNTP, 30 мин при 37 °С. Структуры расщепляемой цепи ДНК и интермедиатов репарации обозначены римскими цифрами: (i) исходная поврежденная цепь ДНК, (iia) продукт расщепления ферментом Fpg, (iib) продукт расщепления ферментом OGG1, (iii) продукт расщепления АП-эндонуклеазами, (iiv) продукт включения одного нуклеотида ДНК-полимеразами. X – охoG, Y – C или T, B – C, G или T, звездочка обозначает 5'-концевую флуоресцентную метку (Cy3).

АРЕ1 и ДНК-полимеразу β человека выделяли по описанным методикам [10–13].

Кинетику реакции, катализируемой ферментом Fpg, можно описать стандартной схемой Михаэлиса – Ментен [14]. На рис. 1в приведены графики, отражающие расщепление исследованных субстратов ферментом Fpg. Зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата носила ожидаемый гиперболический характер. Полученные для разных субстратов значения константы Михаэлиса K_M и каталитической константы k_{cat} сведены в табл. 1. Как видно, для субстрата X.1, в котором охoG находится в однонуклеотидном выпетли-

вании, кинетика реакции не отличается от таковой для стандартной пары охoG:C. Известно, что при узнавании охoG фермент Fpg выворачивает его из спирали ДНК в свой активный центр, и вполне вероятно, что однонуклеотидное выпетливание может имитировать структуру ДНК в этом комплексе. Оба субстрата с двухнуклеотидным выпетливанием, X.2.1 и X.2.2, показывали повышение K_M и снижение k_{cat} в несколько раз, вследствие чего показатель специфичности k_{cat}/K_M был для них примерно в 20 раз ниже, чем для субстратов X.0 и X.1 (см. табл. 1). Очевидно, в этих случаях даже при внеспиральной локализации охoG правильное размещение его в

активном центре затруднено. Для всех изученных субстратов количество продукта не менялось при остановке реакции 0.1 М NaOH, который вызывает разрыв ДНК по AP-сайтам. Это свидетельствует о том, что снижение активности фермента Fpg по отношению к субстратам X.2.1 и X.2.2 происходит именно на уровне гидролиза N-гликозидной связи, а не последующих стадий реакции.

В отличие от Fpg, для фермента OGG1 скорость реакции лимитируется стадией высвобождения продукта [15], поэтому для канонического субстрата (охоG:C) возможно отдельно измерить константу каталитической стадии (k_2) и константу скорости высвобождения продукта (k_3) в условиях кинетики одного оборота ($[E]_0 \gg [S]_0$) и кинетики фазы всплеска ($[E]_0 \ll [S]_0$) соответственно. Даже в случае одонуклеотидного выпетливания каталитическая константа OGG1 была на 1.5–2.0 порядка ниже, чем для канонического субстрата (см. рис. 1з, табл. 1).

Такое снижение приводило к тому, что стадия высвобождения продукта переставала быть скоростьюлимитирующей, на графике накопления продукта со временем отсутствовала характерная фаза всплеска (см. рис. 1д), и определить константу скорости высвобождения продукта было невозможно (см. табл. 1). Таким образом, OGG1 неэффективно использует охоG в составе одно- и двухнуклеотидных выпетливаний как субстрат. Разница с ферментом Fpg, по-видимому, объясняется разницей в общей пространственной структуре и в архитектуре активного центра этих белков, которые принадлежат к разным структурным суперсемействам. Так, активный центр OGG1 более тесный по сравнению с активным центром Fpg; кроме того, оба белка по-разному взаимодействуют с фосфатами, окружающими поврежденный нуклеозид, для его выво- рачивания из ДНК [16, 17].

Для анализа связывания Fpg и OGG1 с субстратной ДНК без ее расщепления методом сайт-направленного мутагенеза получили их каталитически неактивные варианты Fpg E2Q и OGG1 K249Q [16, 18]. Белки выделяли по тем же схемам, что и белки дикого типа. Связывание определяли по изменению подвижности комплекса в неденатурирующем геле; результаты эксперимента приведены в табл. 1. Образование выпетливаний лишь умеренно влияло на сродство обоих белков к ДНК: максимальное повышение K_d наблюдалось для субстрата X2.1 и составляло 3.3 раза для Fpg и 4.5 раз для OGG1. Интересно, что для субстрата X.1 сродство к ДНК-гликозилазам оставалось неизменным или даже несколько повышалось, что, возможно, отражает лучшее связывание ДНК с внеспиральным поврежденным нуклеотидом. Таким образом, ухудшение связывания ДНК не мо-

жет полностью объяснить снижение активности Fpg и OGG1 на 1.5–2.0 порядка при наличии выпетливаний в ДНК.

Дальнейшие шаги репарации после действия ДНК-гликозилаз изучали при помощи реконструкции цикла репарации из очищенных рекомбинантных белков: Fpg, эндонуклеазы IV (Nfo) и фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I (дефицитного по 3'→5'-экзонуклеазной активности) для системы *E. coli* и OGG1, AP-эндонуклеазы APE1 и ДНК-полимеразы β для системы человека. Эффективность образования лигируемого разрыва оценивали с использованием ДНК-лигазы бактериофага T4. При наличии охоG в дцДНК действие Fpg приводит к образованию 3'-концевого фосфата, который затем удаляется Nfo, вызывая снижение электрофоретической подвижности продукта из-за уменьшения общего заряда олигонуклеотидного фрагмента (рис. 2а, дорожки 1–3). ДНК-полимераза затем ведет синтез с вытеснением цепи (см. рис. 2а, дорожка 4) либо при наличии только dGTP в реакционной смеси включает его с образованием лигируемого разрыва (рис. 2, дорожка 14). Аналогичная картина наблюдалась и для субстрата X.1 с некоторым снижением эффективности всех стадий относительно дцДНК (см. рис. 2б). Однако субстраты X2.1 и X2.2 вели себя по-разному: в первом случае цикл репарации проходил до конца с еще более низкой эффективностью, чем для X.0 и X.1, а во втором ДНК-полимеразная реакция не протекала, и продукт имел ту же подвижность, что и после AP-эндонуклеазной реакции (см. рис. 2в, г). В системе репарации человека фермент OGG1 оставляет на 3'-конце α,β -ненасыщенный альдегид, который удаляется AP-эндонуклеазой APE1, однако подвижности продуктов при этом мало отличаются (рис. 2а, дорожки 7, 8, 17, 18). При этом в присутствии APE1 количество расщепленной ДНК возрастает, поскольку собственная AP-лиазная активность фермента OGG1 невысока по сравнению с его ДНК-гликозилазной активностью. В то время как охоG в составе дцДНК полностью репарировался в системе, реконструированной из ферментов человека, AP-эндонуклеазная реакция проходила только в случае субстрата X.1, а образования разрывов с лигируемыми концами на субстратах с выпетливаниями практически не наблюдалось.

Таким образом, в работе показано, что репарация охоG, находящегося в выпетливаниях длиной 1–2 нуклеотида, может служить механизмом фиксации микроделений в ДНК *E. coli* и, вероятно, других бактерий. Однако система эксцизионной репарации оснований человека неэффективно узнает и процессирует подобные субстраты, и в клетках человека такой механизм маловероятен.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Секвенирование ДНК выполнялось сотрудниками Центра коллективного пользования «Геномика» СО РАН. Белок Nfo был любезно предоставлен А.А. Ищенко (Университет Париж-Саклэ, Франция).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований 21-54-12025 НННО_а.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Joshua-Tor L., Frolov F., Appella E., et al. // J. Mol. Biol. 1992. V. 225. № 2. P. 397–431.
2. Jiao Y., Stringfellow S., Yu H. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2002. V. 19. № 5. P. 929–934.
3. Shi X., Beauchamp K.A., Harbury P.ИВ., Herschlag D. // Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 2014. V. 111. № 15. P. E1473–E1480.
4. Kunkel T.A., Bebenek K. // Annu. Rev. Biochem. 2000. V. 69. P. 497–529.
5. Talhaoui I., Matkarimov B.T., Tchenio T., et al. // Free Radic. Biol. Med. 2017. V. 107. P. 266–277.
6. Fleming A.M., Burrows C.J. // DNA Repair. 2017. V. 56. P. 75–83.
7. Moriya M., Ou C., Bodepudi V., et al. // Mutat. Res. 1991. V. 254. № 3. P. 281–288.
8. Markkanen E., Castrec B., Villani G., Hübscher U. // Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 2012. V. 109. № 50. P. 20401–20406.
9. Pande P., Haraguchi K., Jiang Y.-L., et al. // Biochemistry. 2015. V. 54. № 10. P. 1859–1862.
10. Gilboa R., Zharkov D.O., Golan G., et al. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. № 22. P. 19811–19816.
11. Kuznetsov N.A., Koval V.V., Zharkov D.O., et al. // Nucleic Acids Res. 2005. V. 33. № 12. P. 3919–3931.
12. Sidorenko V.S., Nevinsky G.A., Zharkov D. O. // DNA Repair. 2007. V. 6. № 3. P. 317–328.
13. Endutkin A.V., Yudkina A.V., Zharkov T.D., et al. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 21. 13353.
14. Tchou J., Bodepudi V., Shibutani S., et al. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. № 21. P. 15318–15324.
15. Zharkov D.O., Rosenquist T.A., Gerchman S.E., Grollman A. P. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 37. P. 28607–28617.
16. Bruner S.D., Norman D.P.G., Verdine G.L. // Nature. 2000. V. 403. № 6772. P. 859–866.
17. Fromme J.C., Verdine G.L. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. № 51. P. 51543–51548.
18. Lavrukhin O.V., Lloyd R.S. // Biochemistry. 2000. V. 39. № 49. P. 15266–15271.

ABERRANT REPAIR OF 8-OXOGUANINE IN SHORT DNA BULGES

D. A. Eroshenko^{a, b}, E. A. Diatlova^a, V. M. Golyshev^a, A. V. Endutkin^a,
Corresponding Member of the RAS D. O. Zharkov^{a, b, #}

^aInstitute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

^bNovosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

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

The presence of DNA damage can increase the likelihood of DNA replication errors and promote mutations. In particular, pauses of DNA polymerase at the site of damage can lead to polymerase slippage and the formation of 1–2 nucleotide bulges. Repair of such structures using an undamaged DNA template leads to small deletions. One of the most abundant oxidative DNA lesions, 8-oxoguanine (oxoG), has been shown to induce small deletions but the mechanism of this phenomenon is currently unknown. We have studied the aberrant repair of oxoG, located in one- and two-nucleotide bulges, by the *Escherichia coli* and human base excision repair systems. Our results indicate that the repair in such substrates can serve as a mechanism for fixing small deletions in bacteria but not in humans.

Keywords: DNA damage, mutagenesis, DNA repair, DNA glycosylases, 8-oxoguanine, Fpg, OGG1.

УДК 577.213.3:576.316.352:595.773.4

КОМБИНАЦИЯ МУТАЦИЙ ГЕНОВ *OTU* И *RIF^r* ПОЗВОЛЯЕТ АНАЛИЗИРОВАТЬ САТЕЛЛИТНУЮ ДНК В ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМАХ ГЕРМИНАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЯИЧНИКОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2024 г. Т. Д. Колесникова^{1,*}, А. Р. Нохова², А. С. Шацких³, М. С. Кленов⁴, академик РАН И. Ф. Жимулев¹

Поступило 06.12.2023 г.

После доработки 08.12.2023 г.

Принято к публикации 09.12.2023 г.

Политенные хромосомы дрозофилы – классическая модель для цитогенетических исследований. Однако гетерохроматиновые районы хромосом обычно недореплицированы, что препятствует их анализу. Мутации гена *Rif^r* приводят к дополнительной репликации гетерохроматиновых последовательностей, включая сателлитную ДНК, в клетках слюнных желез. В настоящей работе мы исследовали влияние мутации *Rif^r* на представленность гетерохроматина в политенных хромосомах, которые формируются в герминальных питающих клетках яичников при мутации гена *otu*. Мы вывели линию *otu¹¹; Rif^{r1}* и обнаружили, что на фоне мутации *Rif^r* в клетках яичников происходит дополнительная политенизация прицентромерных районов, в том числе появляются крупные хроматиновые блоки, образованные сателлитной ДНК. Таким образом, эффекты мутации *Rif^r* оказались схожи в герминальных клетках и клетках слюнных желез. Система *otu¹¹; Rif^{r1}* открывает новые возможности для изучения факторов, ассоциированных с гетерохроматином, в процессе оогенеза.

Ключевые слова: политенные хромосомы, псевдопитающие клетки, *Rif^r*, недорепликация, гетерохроматин, сателлитная ДНК.

DOI: 10.31857/S2686738924020048, EDN: WFYUYA

Области конститутивного гетерохроматина, занимающие более трети генома *D. melanogaster*, состоят преимущественно из последовательностей мобильных элементов и высокоповторенной сателлитной ДНК, но также содержат важные для клетки функциональные элементы [1]. В политенных хромосомах (ПХ) *D. melanogaster* дикого типа гетерохроматиновые районы хромосом обычно практически не представлены вследствие явления недорепликации [2]. Недавно было обнаружено, что мутации гена *Rif^r*, консервативного регулято-

ра репликационного тайминга, приводят к полной репликации аннотированной области гетерохроматина в клетках слюнных желез (СЖ) [3]. Кроме того, на фоне мутаций *Rif^r* значительно подавлена недорепликация tandemных повторов – сателлитов и рибосомных генов [4].

Политенные хромосомы у дрозофилы могут образовывать не только клетки СЖ, но и герминальные клетки яичников. Яичники дрозофилы состоят из овариол – цепочек яйцевых камер, находящихся на разных этапах развития. Каждая яйцевая камера содержит оболочку соматических клеток, развивающийся ооцит и 15 герминальных питающих клеток, которые транскрипционно высокоактивны, поскольку обеспечивают продукцию белков и других факторов для развития транскрипционно-инертного ооцита. Хромосомы питающих клеток у мух дикого типа полиплоидны (до 8192 С), но не политенны [5]. Однако они могут стать политенными в результате определенных мутаций, например при мутации гена *otu* (*ovarian tumor*) [6]. Одним из аллелей, вызывающих образование политенных хромосом с четкой дисковой структурой в питающих

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

⁴Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

*E-mail: doliolida@gmail.com

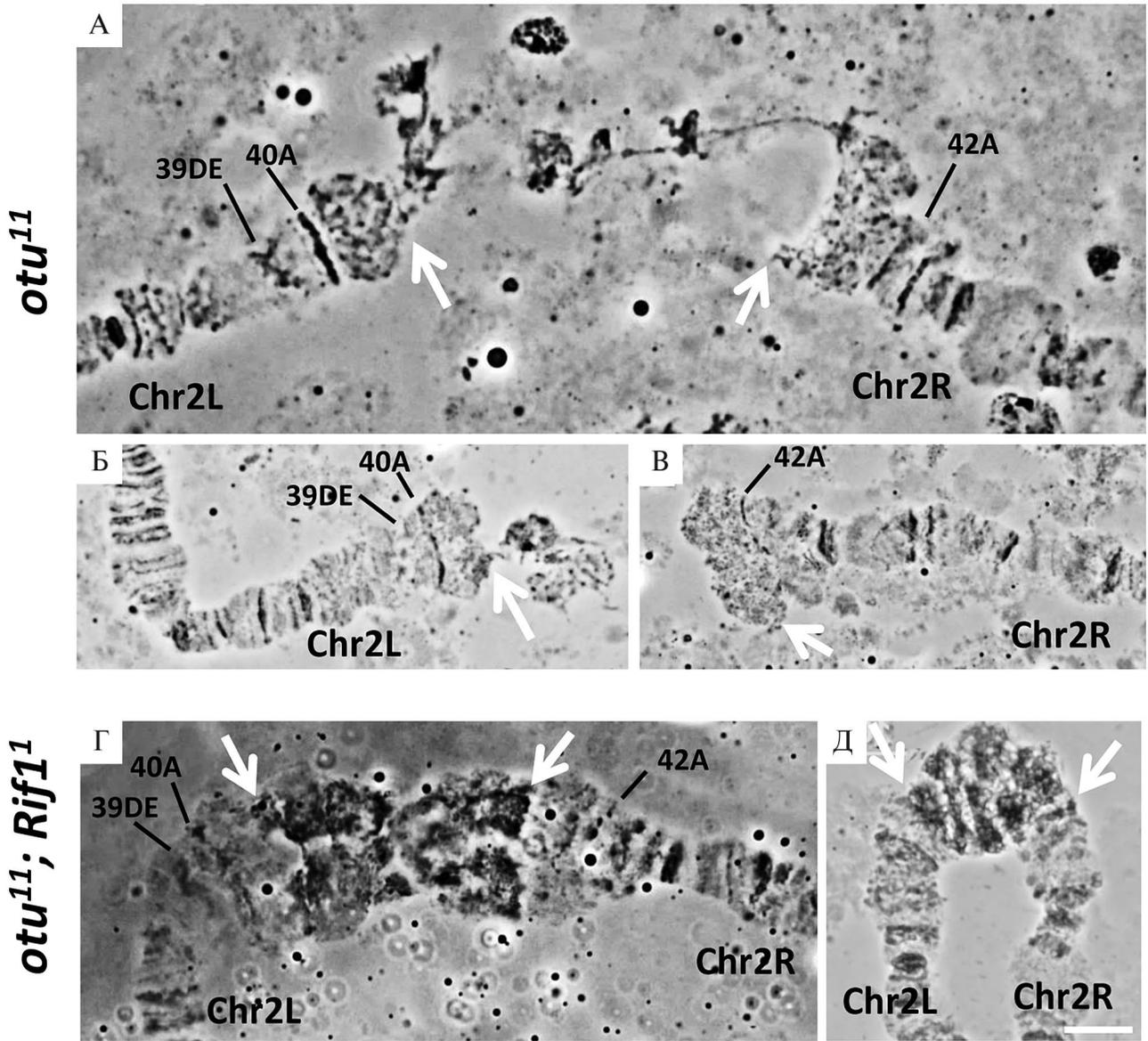


Рис 1. Мутация *Rif1* приводит к дополнительной политенизации прицентромерных районов в ППК. Показан прицентромерный район хромосомы 2 в ППК мутантов *otu¹¹* (А-В) и мутантов *otu¹¹; Rif1¹* (Г, Д). На фоне *Rif⁺* политенизированные плечи хромосомы 2 могут соединяться тонкими тяжами гетерохроматина (А). В других случаях левое (Б) и правое (В) плечи хромосомы 2 лежат отдельно друг от друга. Белые стрелки указывают на концы политенизированных участков хромосом. На фоне мутации *Rif1¹*, зона, фланкированная белыми стрелками, политенизируется, а хромосома 2 выглядит как единое целое и представлена блоками компактного хроматина, интенсивно окрашивающегося ацето-орсеином. Окраска – ацетоорсеином, фазовый контраст. Масштаб – 10 мкм.

клетках, является *otu¹¹* [6, 7]. При этом питающие клетки мутантов *otu* именуется псевдопитающими (ППК), потому что их морфология отличается от клеток дикого типа, и в яйцевых камерах часто отсутствуют ооциты, по отношению к которым питающие клетки выполняют трофическую функцию [8]. Стоит отметить, что в питающих клетках, в отличие от клеток СЖ, недорепликация гетерохроматина начинается не с первого, а только с пятого цикла репликации [9]. Вследствие этого в таких

хромосомах несколько снижена недорепликация гетерохроматина по сравнению с политенными хромосомами СЖ, что ведет к появлению дополнительных политенизированных блоков и уменьшению частоты разломов хромосом [10, 11]. Однако в целом политенные хромосомы СЖ и ППК схожи между собой: дисковые паттерны хорошо коррелируют, проявляя лишь незначительные различия [7].

Целью данного исследования было проверить, будет ли мутация гена *Rif¹* влиять на недореплика-

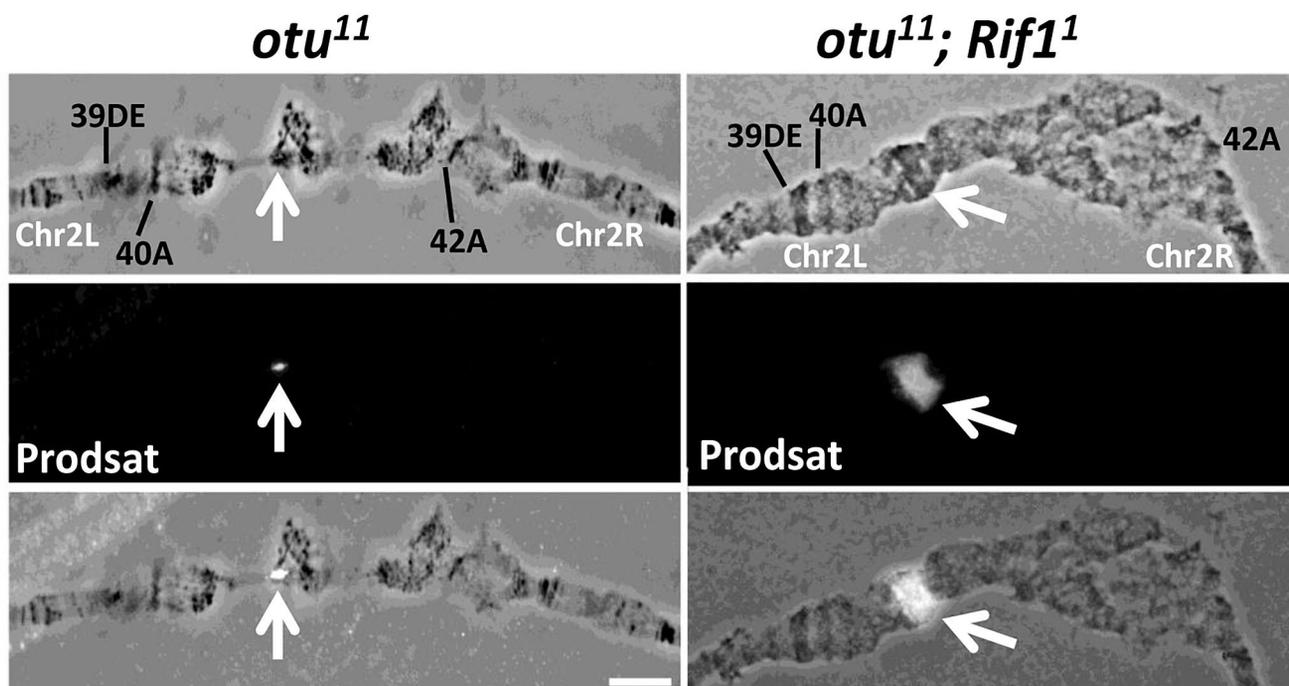


Рис. 2. Мутация *Rif1¹* приводит к политенизации сателлита Prodsat в хромосоме 2 ППК. Приведены фазово-контрастные изображения с окраской ацетоорсеином (верхний ряд), результат гибридизации *in situ* зонда к сателлиту Prodsat (средний ряд) и наложение сигнала на фазово-контрастное изображение (нижний ряд). Масштаб — 10 мкм.

цию гетерохроматина в политенных хромосомах клеток зародышевого пути — ППК. Для этого мы вывели линию *otu¹¹; Rif1¹* и охарактеризовали влияние *Rif1¹* на гетерохроматиновые районы политенных хромосом в питающих клетках. Для объединения двух мутаций в одном генотипе вторая хромосома линии у *w otu¹¹ sn¹/FM3* [7] была заменена на вторую хромосому из линии *w¹¹⁸; Rif1¹* [3]. В результате была получена линия с генотипом у *w otu¹¹ sn¹/FM3; Rif1¹*.

Для анализа политенных хромосом из ППК самок, гомозиготных по хромосоме у *w otu¹¹ sn¹*, содержали на питательной среде с добавлением сухих дрожжей при температуре 18 °С. Для получения препаратов политенных хромосом из самок возрастом 8–12 дней извлекали яичники в растворе PBS, затем переносили их в каплю ацетоорсеина (1%-й орсеин в 45%-й уксусной кислоте) на 20–30 мин, а после этого — в каплю 55%-й молочной кислоты, в которой яичники разделяли на отдельные яйцевые камеры.

Для анализа выбирали камеры, содержащие крупные ядра питающих клеток круглой формы. Отобранные яйцевые камеры переносили пипеткой в каплю 55%-й молочной кислоты на покровное стекло и накрывали предметным стеклом. После легкого постукивания препаративной иглой под контролем настольного микроскопа и удаления лишней жидкости при помощи фильтровальной бумаги покровное стекло придавливали пальцем

через фильтровальную бумагу для достижения оптимального распластывания и расправления хромосом. Препараты анализировали при помощи микроскопа Olympus BX51, с объективом 100×/1.30 Uplan FI Ph3 и цифровой камерой DP52.

В ядрах ППК мутантов *otu¹¹* политенные хромосомы не формируют общий хромоцентр: на препаратах плечи аутосом либо лежат отдельно, либо соединяются тонкими нитями (рис. 1А–В). Введение мутации *Rif1¹* привело к резкому изменению морфологии прицентромерных районов. Плечи хромосом оказались соединены блоками компактного материала (рис. 1Г, Д).

Ранее мы показали, что в СЖ такое изменение морфологии связано с политенизацией сателлитной ДНК. Для проверки влияния мутации *Rif1¹* на политенизацию сателлитной ДНК в ППК мы провели *in situ* гибридизацию (FISH) с зондом к сателлиту Prodsat (AATAACATAG), занимающему протяженные участки гетерохроматина в хромосомах 2L и 3R вблизи центромер [12]. Ранее политенизация этого сателлита на фоне мутации *Rif1¹* была нами показана в политенных хромосомах СЖ [4]. Чтобы добиться наилучшей морфологии хромосом на препаратах для FISH из ППК, мы разработали новый подход приготовления препаратов, включающий дополнительную окраску хромосом ацетоорсеином. На первом этапе препараты хромосом готовили по схеме, описанной выше. Затем

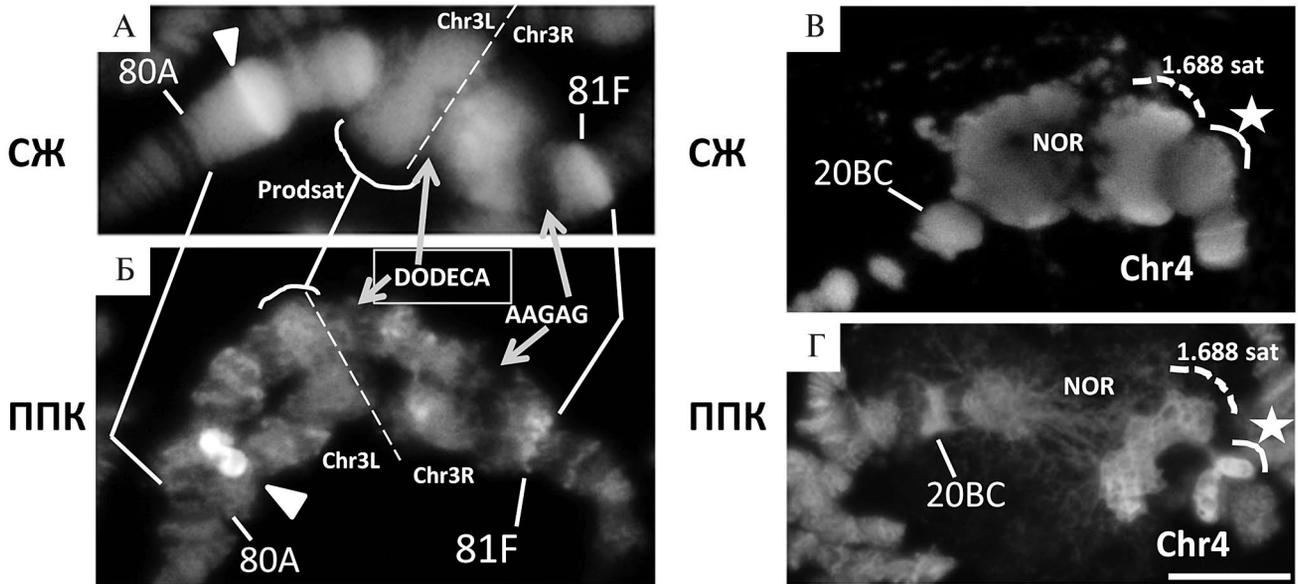


Рис. 3. Окрашенные DAPI прицентромерные районы хромосомы 3 в политенных хромосомах СЖ (А) и ППК (Б) на фоне мутации *Rif^I*. Участок, ограниченный районами 80А и 81F, соответствует митотическому гетерохроматину хромосомы 3. Стрелками и линиями показаны районы, имеющие сходную морфологию в двух типах клеток, а также указан предполагаемый состав ДНК для некоторых районов согласно [4]. Белый треугольник указывает на DAPI-позитивный блок, соответствующий блоку h48 карты митотического гетерохроматина. Скобкой выделено положение сателлита Prodsat, фланкирующего центромеру хромосомы 3. Приблизительное положение центромеры указано пунктирной линией, пересекающей хромосому в соответствии с [4] для политенных хромосом СЖ и по сходству морфологии соответствующих районов в ППК. В,Г. Объединенные прицентромерные районы политенных хромосом X и 4 в СЖ (В) и ППК (Г). Окрашивание – DAPI, масштаб – 10 мкм.

препараты прогревали на настольном термостате при 70°C 10 с для лучшего прикрепления хромосом к стеклу, фотографировали хромосомы при помощи фазово-контрастного микроскопа, после чего препараты замораживали в жидком азоте, скалывали покровное стекло, дофиксировали и хранили в 96%-й этаноле при температуре –18 °С. В хромосомах ППК мутантов *otu¹¹*; *Rif^I* наблюдалось резкое усиление сигнала FISH Prodsat по сравнению с *otu¹¹* (рис. 2). В ППК одиночных мутантов *otu¹¹*, несмотря на то что там проходит несколько раундов полной репликации генома, этот сателлит представлен лишь маленькой точкой.

Снижение недорепликации сателлитов в политенных хромосомах СЖ у *Rif^I*-мутантов приводит к появлению крупных чередующихся блоков DAPI-позитивного и DAPI-негативного материала, которые соответствуют тем же блокам в метафазных хромосомах *D. melanogaster*. Таким образом, можно получить своего рода “дифференциальное окрашивание”, выявляющее блоки разных сателлитов, что позволяет изучать особенности организации хроматина, которые связаны с сателлитной ДНК, а также облегчает идентификацию сателлитов [4]. Для доказательства дополнительной политенизации сателлитной ДНК на фоне *Rif^I* в ППК мы провели более детальный анализ морфологии прицентромерных районов хромосом с помощью окрашивания

DAPI (рис. 3). Для этого препараты, приготовленные по методике, описанной выше, замораживали в жидком азоте, скалывали покровное стекло, дофиксировали в 96%-й этаноле, высушивали и покрывали средой VectaShield с добавлением 0.15 мкг/мл DAPI.

На примере хромосомы 3 можно видеть, что чередование DAPI-позитивных и DAPI-негативных блоков в прицентромерных районах политенных хромосом СЖ и ППК мутантов по гену *Rif^I* сходно и позволяет визуализировать отдельные блоки политенизированных сателлитов (см. рис. 3).

Например, DAPI-негативный блок сателлита ААГАГ характерен для политенных хромосом обоих типов. В хромосомах ППК мутантов *otu¹¹*; *Rif^I* наблюдается характерное для политенных хромосом СЖ мутантов по гену *Rif^I* объединение прицентромерных районов хромосом X и 4 (см. рис. 3 В,Г). Отчетливо видна зона, соответствующая ядрышкообразующему району (NOR). В основании хромосомы 4 расположены два сходных в двух типах клеток крупных блока DAPI-позитивного материала, соответствующие в ПХ СЖ блокам сателлита 1.688 и тандемным повторам типа ААНАН из гетерохроматина хромосомы 4 и проксимального гетерохроматина хромосомы X (см. рис. 3В,Г).

Чтобы дополнительно подтвердить, что сходные по морфологии блоки гетерохроматина в хромо-

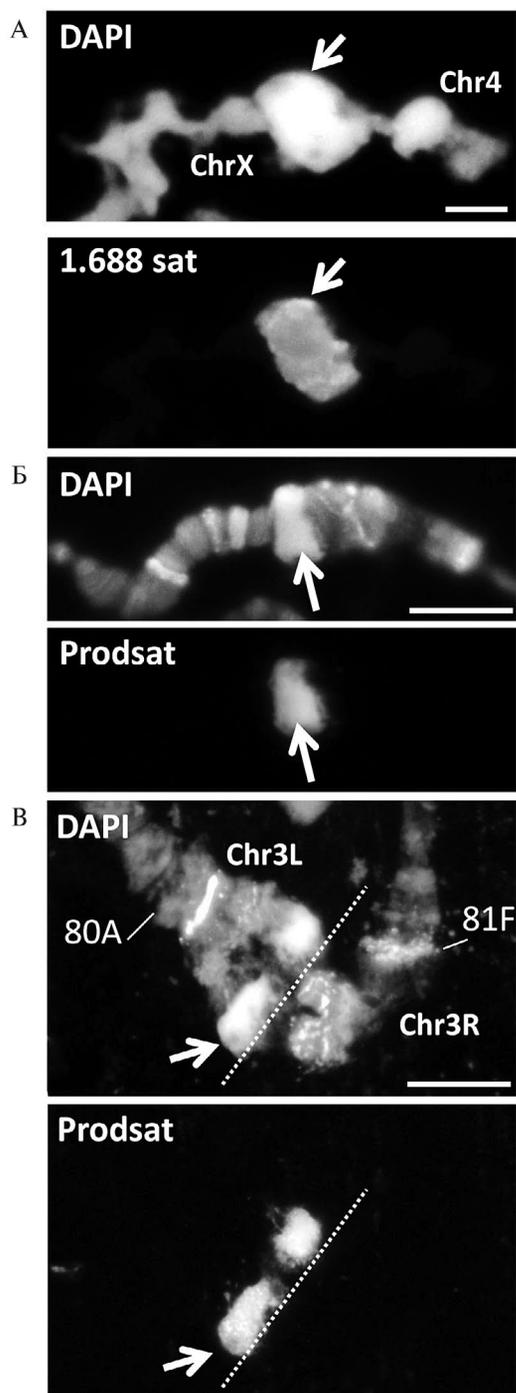


Рис. 4. Результаты FISH с зондами к сателлитам 1.688 и Prodsat в политенных хромосомах ППК (А,В) и СЖ (Б) мутантов *otu¹¹*; *Rif1¹*. А. Один из двух блоков DAPI-позитивного материала в основании хромосомы 4 гибридизуется с пробой к сателлиту 1.688, что соответствует выводу, сделанному на основании морфологического анализа. Выявление фланкирующего центромеру хромосомы 3 сателлита Prodsat в СЖ (Б) и ППК (В). Положение сигнала полностью соответствует предсказанию, сделанному на основе анализа морфологии. Окрашивание – хромосом DAPI. Положения сигнала отмечены стрелками. Масштаб – 10 мкм.

сомах СЖ и ППК – это одни и те же блоки сателлитной ДНК, мы провели FISH сателлитов 1.688 и Prodsat. Мы показали, что в ППК сателлит 1.688 выявляется в виде протяженного блока, присоединенного к хромосоме 4. Сателлит Prodsat, который фланкирует хромоцентры аутосом, выявляется в хромосомах 3 в виде большого блока DAPI-позитивного материала в середине гетерохроматина хромосомы 3 как в СЖ (рис.4 Б), так и в ППК (рис. 4В). Эти результаты полностью соответствуют нашим ожиданиям, основанным на данных, полученных ранее для политенных хромосом СЖ мутантов *Rif1¹*.

В целом наши данные позволяют заключить, что в политенных хромосомах клеток зародышевого пути, так же как и в клетках слюнных желез, репликация гетерохроматиновых областей генома и сателлитной ДНК находится под контролем белка *Rif¹*. Комбинация мутаций *otu¹¹*; *Rif1¹* приводит к появлению в герминальных клетках яичников политенных хромосом с полностью реплицированными прицентромерными областями, структура которых аналогична таковой в политенных хромосомах клеток слюнных желез мутантов по гену *Rif¹*. Система *otu¹¹*; *Rif1¹* может быть использована для изучения районов гетерохроматина и связанных с ними белков в процессе оогенеза, что представляет особый интерес в связи с существованием герминально-специфичных механизмов репрессии мобильных элементов и сателлитов [13–15].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Д. Е. Корякова за помощь в освоении работы с хромосомами ППК.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Часть работы, связанная с морфологическим анализом хромосом питающих клеток, была выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00051-П). Часть работы, связанная с проведением гибридизации *in situ* выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00382).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

В соответствии с пунктом 3 главы 1 Директивы 2010/63/ЕС от 2.09.2022 г. о защите животных, используемых в научных целях, требования биоэтики не распространяются на объект данного исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marsano R.M., Giordano E., Messina G., et al. A New Portrait of Constitutive Heterochromatin: Lessons from *Drosophila melanogaster* // Trends Genet. 2019. V. 35. P. 615–631.
2. Zhimulev I.F. Polytene Chromosomes, Heterochromatin, and Position Effect Variegation // Adv. Genet. 1998. V. 37. P. 1–555.
3. Munden A., Rong Z., Sun A., et al. Rif1 inhibits replication fork progression and controls DNA copy number in *Drosophila* // eLife. 2018. V.7. e39140.
4. Kolesnikova T.D., Kolodyazhnaya A.V., Pokholkova G.V., et al. Effects of Mutations in the *Drosophila melanogaster* *Rif1* Gene on the Replication and Underreplication of Pericentromeric Heterochromatin in Salivary Gland Polytene Chromosomes // Cells. 2020. V. 9. P. 1501.
5. McLaughlin J.M., Bratu D.P. *Drosophila melanogaster* Oogenesis: An Overview // Methods Mol Biol. 2015. V. 1328. P. 1–20.
6. King R.C., Riley S.F., Cassidy, J.D., et al. Giant polytene chromosomes from the ovaries of a *Drosophila* mutant // Science. 1981. V. 212. P. 441–443.
7. Mal'ceva N.I., Gyurkovics H., Zhimulev I.F. General characteristics of the polytene chromosome from ovarian pseudonurse cells of the *Drosophila melanogaster* *otu11* and *fs(2)B* mutants // Chromosome. 1995. Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol. V. 3. P. 191–200.
8. Heino T.I. Polytene chromosomes from ovarian pseudonurse cells of the *Drosophila melanogaster* *otu* mutant. I. Photographic map of chromosome 3 // Chromosoma. 1989. V. 97. P. 363–373.
9. DeJ K.J., Spradling A.C. The endocycle controls nurse cell polytene chromosome structure during *Drosophila* oogenesis // Dev. Camb. Engl. 1999. V. 126. P. 293–303.
10. Mal'ceva N.I., Zhimulev I.F. Extent of polytene in the pericentric heterochromatin of polytene chromosomes of pseudonurse cells of *otu* (ovarian tumor) mutants of *Drosophila melanogaster* // Mol. Gen. Genet. 1993. V. 240. P. 273–276.
11. Koryakov D.E., Domanitskaya E.V., Belyakin S.N., et al. Abnormal tissue-dependent polytenization of a block of chromosome 3 pericentric heterochromatin in *Drosophila melanogaster* // J. Cell Sci. 2003. V. 116. P. 1035–1044.
12. Garavís M., Méndez-Lago M., Gabelica V., et al. The structure of an endogenous *Drosophila* centromere reveals the prevalence of tandemly repeated sequences able to form i-motifs // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 13307.
13. Yang F., Xi R. Silencing transposable elements in the *Drosophila* germline // Cell Mol Life Sci. 2017. V. 74. P. 435–448.
14. Sato K., Siomi M.C. The piRNA pathway in *Drosophila* ovarian germ and somatic cells // Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2020. V. 96. P. 32–42.
15. Wei X., Eickbush D.G., Speece I., et al. Heterochromatin-dependent transcription of satellite DNAs in the *Drosophila melanogaster* female germline // Elife. 2021. V. 10. e62375.

OTU AND RIF¹ DOUBLE MUTANT ENABLES ANALYSIS OF SATELLITE DNA IN POLYTENE CHROMOSOMES OF OVARIAN GERM CELLS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

T. D. Kolesnikova^{a,*}, A. R. Nokhova^b, A. S. Shatskikh^c, M. S. Klenov^d,
Academician of the RAS I. F. Zhimulev^a

^aInstitute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russia

^bNovosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

^cNational Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, Russian Federation

^dInstitute of Molecular Genetics RAS, Moscow, Moscow, Russian Federation

*E-mail: doliolida@gmail.com

Polytene chromosomes in *Drosophila* serve as a classical model for cytogenetic studies. However, heterochromatic regions of chromosomes are typically under-replicated, hindering their analysis. Mutations in the *Rif¹* gene lead to additional replication of heterochromatic sequences, including satellite DNA, in salivary gland cells. Here, we investigated the impact of the *Rif¹* mutation on heterochromatin in polytene chromosomes formed in ovarian germ cells due to the *otu* gene mutation. By the analysis of *otu¹¹; Rif¹* double mutants, we found that, in the presence of the *Rif¹* mutation, ovarian cells undergo additional polytenization of pericentromeric regions. This includes the formation of large chromatin blocks composed of satellite DNA. Thus, the effects of the *Rif¹* mutation were similar in salivary gland and germ cells. The *otu¹¹; Rif¹* system opens new possibilities for studying factors associated with heterochromatin during oogenesis.

Keywords: polytene chromosomes, pseudonurse cells, *Rif¹*, under-replication, heterochromatin, satellite DNA.

УДК 577.2

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПИСАНИЕ ДЕГРАДАЦИИ N-БЕЛКА ВИРУСА SARS-CoV-2 В КЛЕТКАХ, СТАБИЛЬНО ЕГО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ, ПОД ДЕЙСТВИЕМ НОВЫХ МОДУЛЬНЫХ НАНОТРАНСПОРТЕРОВ

© 2024 г. Ю. В. Храпцов¹, А. В. Уласов¹, Т. Н. Лупанова¹,
академик РАН Г. П. Георгиев¹, член-корреспондент РАН А. С. Соболев^{1,2,*}

Поступило 29.11.2023 г.

После доработки 10.12.2023 г.

Принято к публикации 11.12.2023 г.

Были получены две линии эукариотических клеток A549 и A431 со стабильной экспрессией нуклеокапсидного белка (N-белка) вируса SARS-CoV-2, слитого с красным флуоресцентным белком mRuby3. С помощью микроскопии для данных клеток были определены объемы цитоплазмы и ядра. Используя методы количественного иммуноблоттинга, были оценены концентрации слитого белка N-mRuby3 в их цитоплазме. Они составили 19 и 9 мкМ для клеток A549 и A431 соответственно. Используя эти концентрации, по уменьшению флуоресценции клеток была оценена начальная скорость деградации N-белка в изучаемых клетках. В клетках A549 и A431 она оказалась одинаковой и равной 84 нМ/ч. Подход по количественному описанию процесса деградации можно применить для анализа эффективности широкого класса противовирусных препаратов, вызывающих деградацию вирусных белков.

Ключевые слова: нуклеокапсидный белок, SARS-CoV-2, иммуноблоттинг, внутриклеточные концентрации, направленная деградация белков.

DOI: 10.31857/S2686738924020053, EDN: WFRQEA

При разработке новых противовирусных препаратов, в частности против коронавируса SARS-CoV-2, часто бывает необходимо получение модельных клеточных систем для изучения данного вируса. Для большинства вирусов существуют ключевой белок или белки, без которых невозможно образование вирусного капсида. Примером одного из таких белков может служить нуклеокапсидный белок или N-белок вируса SARS-CoV-2 [1–3]. Так, обычное взаимодействие с этим белком антителоподобных молекул может привести к нарушению образования вирусного капсида, т.е. препятствовать распространению вирусной инфекции [4]. Взаимодействие с данным белком различных препаратов удобнее всего исследовать на клетках, с временной или стабильной экспрессией данного белка. В данной работе в качестве модели были получены две линии клеток, со стабильной экспрессией N-белка вируса SARS-CoV-2. Многие системы доставки ши-

роко используют различные антителоподобные молекулы [5]. Так, ранее мы показали, что модульные нанотранспортеры (МНТ), содержащие NC2 монободии [6] к N-белку вируса SARS-CoV-2, способны связываться с этим белком как в растворе, так и в клетке [7]. Если включить в эти МНТ аминокислотную последовательность DPETGEYL, способную с высоким сродством связываться с убиквитинлигазой Keap1 [8], то одновременное связывание МНТ с Keap1 и N-белком предположительно должно привести к деградации N-белка как следствие его убиквитинирования [9]. Настоящая работа посвящена количественному описанию процесса деградации N-белка в клетках под влиянием МНТ, для чего прежде всего была оценена внутриклеточная концентрация N-белка в полученных линиях клеток.

Клетки A549 и A431 со стабильной экспрессией N-белка, слитого с флуоресцентным белком mRuby3 (N-mRuby3), получали путем лентивирусной трансфекции клеток, используя плазмиды pMD2.G, psPAX2 и pHAGE N-mRuby3 (из SARS-CoV-2) IRES puro (Addgene). Рекombинантные лентивирусные частицы получали контрастфекцией клеток HEK293T в 25 см² флаконе с помощью 2.3 мкг pMD2.G, 4.3 мкг psPAX2 и 10.2 мкг pHAGE N-mRuby3 (from SARS-CoV-2) IRES puro,

¹Институт биологии гена Российской Академии наук, Москва

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

*E-mail: alsobolev@yandex.ru

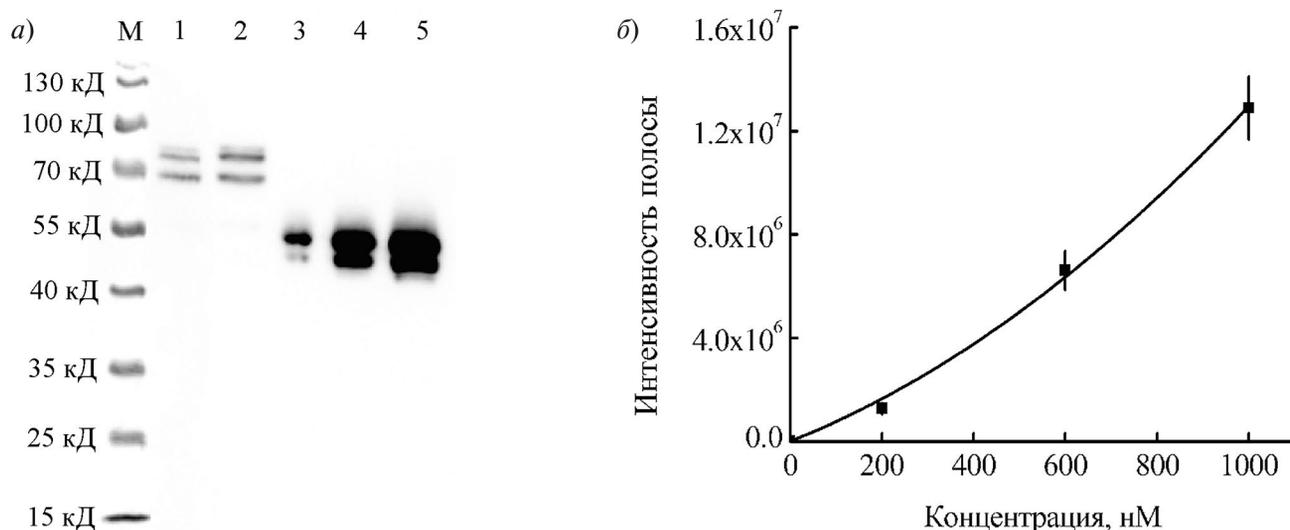


Рис. 1. Вестерн-блот с антителами на N-белок вируса SARS-CoV-2 для лизатов трансфицированных N-mRuby3 клеток A549 (1) и клеток A431 (2) и рекомбинантного N-белка концентраций: 200 нМ (3), 600 нМ (4) и 1000 нМ (5). М – белковые стандарты (а); калибровочная кривая зависимости суммарной интенсивности полосы на вестерн-блоте от концентрации N-белка (б).

используя Calcium Phosphate Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific). Суспензию вируса собирали спустя 72 ч после трансфекции. Лентивирус сконцентрировали, используя Lenti-X concentrator (Takara Bio), согласно прилагаемому фирмой протоколу. Клетки аденокарциномы легких человека A549 и эпидермоидной карциномы человека A431 были рассеяны в 24-луночные плашки ($1 \cdot 10^4$ клеток на лунку) за один день перед вирусной инфекцией. Для осуществления лентивирусной трансфекции лентивирусные частицы добавлялись в культуральную среду, содержащую 10 мкг/мл polybrene (Sigma-Aldrich). Стабильные клеточные линии отбирали на среде, содержащей 1 мкг/мл пиримидина (Acros Organics). Наличие трансфекции клеток слитым белком N-mRuby3 определяли как визуально, с помощью конфокальной микроскопии в канале mRuby3, используя мультифотонный сканирующий микроскоп LSM 510 META NLO (Carl Zeiss, Германия) и объектив с увеличением 20 \times (NA 0.4), так и с помощью вестерн-блота с антителами на N-белок (PA5-116894, Invitrogen) (рис. 1а).

Экспрессию МНТ проводили в штамме *E. coli* Ros(DE3)pLysS. Автоиндукцию экспрессии МНТ проводили инкубацией в течение 48 ч при 18 °С. МНТ выделяли из растворимой фракции [10], а затем очищали аффинной хроматографией на носителе HisTrap FF (Cytiva). Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле продемонстрировал достаточную степень чистоты полученного МНТ (86.6%).

В результате анализа, проведенного так же, как это описано в [11], 69–87 изображений откреплен-

ных от подложки клеток были определены объемы клеток и их ядер; они дали следующие значения: объемы клеток – 1814 ± 87 и 1450 ± 37 мкм³, объемы ядер – 374 ± 28 и 160 ± 7 мкм³ для клеток A549 и A431 соответственно. Слитый белок N-mRuby3 находился преимущественно в цитоплазме клеток A549 и A431. Объемы цитоплазмы клеток составляли 1439 ± 91 и 1289 ± 38 мкм³ для клеток A549 и A431 соответственно. Эти размеры использовали в дальнейшем для расчета концентрации N-mRuby3 в цитоплазме.

Полученные клетки A549 и A431 собрали с подложки с помощью обработки трипсином и последующего центрифугирования. Затем клетки суспендировали в 100 мкл фосфатного буфера (pH 8.0), содержащего cOmplete (EDTA free protease inhibitor cocktail, 11873580001, www.sigmaaldrich.com) и 10 мМ EDTA. Количество клеток в изучаемых образцах измеряли на проточном цитофлуориметре MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec GmbH, Франция). Клетки были лизированы тремя циклами замораживания в жидком азоте-оттаивания при 37 °С. При лизисе клеток N-белок выходит из них и распределяется во всем объеме образца. Отношение объема образца к суммарному объему цитоплазмы всех клеток, которые были в образце до лизиса, т.е. так называемый коэффициент разбавления, было 126–280 и 197–371 для клеток A549 и A431, соответственно (по 3–4 образца с разной концентрацией клеток).

Измерение концентрации белка N-mRuby3 в лизатах клеток A549 и A431 проводили, с помощью калибровочных растворов N-белка известных кон-

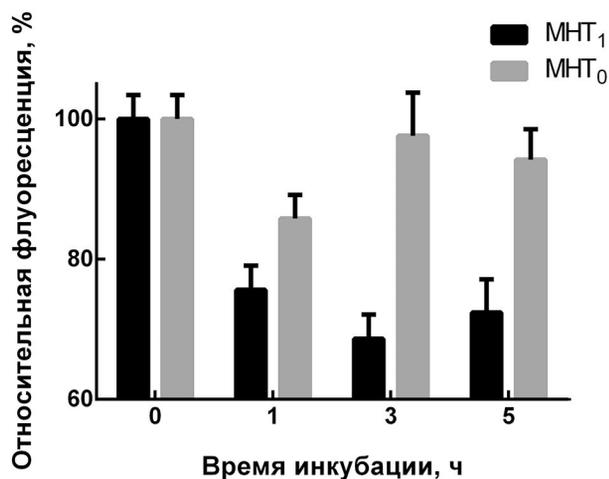


Рис. 2. Зависимость между концентрацией N-белка, подвергающегося деградации, и временем инкубации с 500 нМ МНТ клеток A431 и A549, стабильно экспрессирующих N-белок, слитый с mRuby3. Указаны средние значения с соответствующей среднеквадратичной ошибкой ($n = 8-17$).

центраций. Используемый для этих целей N-белок получали и очищали, как описано в [7]; чистота N-белка составила 98.9%. Полученные лизаты клеток A549 и A431 наносили на полиакриламидный гель вместе с N-белком известной концентрации. После электрофореза проводили иммуноблоттинг: образцы переносили на 0.22-мкм нитроцеллюлозную мембрану и прокрашивали антителами на N-белок и вторичными антителами goat-antirabbit+Peroxidase (G21234, ThermoFisher Scientific) (см. рис. 1a). По известной концентрации N-белка строили калибровочные зависимости (см. рис. 1b), а по ним рассчитывали концентрацию N-белка в изучаемых образцах. Зная коэффициент разбавления белка N-mRuby3 при лизисе клеток и концентрацию N-белка в лизатах, рассчитали концентрацию N-mRuby3 в цитоплазме клеток: 19.0 ± 1.3 и 9.0 ± 1.8 мкМ для клеток A549 и A431 соответственно.

Различия в концентрациях N-mRuby3 в клетках A549 и A431 хорошо заметны при флуоресцентной их микроскопии: интенсивность флуоресценции клеток A549 заметно выше, чем клеток A431. Если рассчитать среднюю флуоресценцию mRuby3 в области клеток и вычесть из нее среднюю флуоресценцию шумового сигнала (для мест, где нет клеток), то отношение флуоресценции mRuby3 для клеток A549 к флуоресценции клеток A431 составит 1.6 ± 0.2 . Это близко к определенному нами отношению концентраций N-mRuby3 для этих двух линий клеток (2.1 ± 0.4). Таким образом, различие флуоресценции клеток A549 и A431 отражает различие концентраций белка N-mRuby3 в этих клетках.

За процессом деградации слитого белка N-mRuby3 в клетках A431 и A549 наблюдали с использова-

Таблица 1. Относительная флуоресценция клеток A431 и A549 (флуоресценция клеток, к которым не добавлялся МНТ, была принята за 100%) при их инкубации различные времена с 500 нМ МНТ. Указаны средние значения с соответствующей среднеквадратичной ошибкой ($n = 8-17$).

Время инкубации, ч	A431	A549
0	100.00 ± 0.48	100.00 ± 0.77
15	86.04 ± 3.31	94.89 ± 2.44
24	74.63 ± 3.41	89.20 ± 1.36
39	60.55 ± 1.59	85.69 ± 1.30
48	63.35 ± 1.94	88.43 ± 1.11

нием проточной цитофлуориметрии на приборе CytoFLEX S (Beckman Coulter) MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec, Франция) в канале флуоресценции 564–606 нм, флуоресценцию возбуждали лазером с длиной волны 561 нм. Клетки с временной экспрессией белка N-mRuby3 инкубировали с 500 нМ МНТ в течение заданного времени, отмывали, снимали с подложки и изучали на проточном цитофлуориметре. В Таблице показаны значения флуоресценции клеток A431 и A549 при различных временах инкубации с МНТ. Считая, что падение флуоресценции обусловлено деградацией белка N-mRuby3, и зная концентрации N-белка в изучаемых линиях клеток, можно рассчитать зависимость концентрации N-белка, подвергающегося деградации, от времени инкубации с МНТ (рис. 2). Оказалось, что для клеток A431 и A549 эти зависимости дают одну и ту же начальную скорость деградации N-белка, равную 84 ± 7 нМ/ч (рис. 2). Следует отметить, что реальная скорость деградации N-белка может быть больше, так как флуоресцентный белок mRuby3, как и другие флуоресцентные белки, может деградировать не полностью [12], а значит, даже после деградации возможна остаточная флуоресценция mRuby3.

Таким образом, в предложенной работе были получены линии клеток A431 и A549 со стабильной экспрессией N-белка, слитого с флуоресцентным белком mRuby3. МНТ, добавленный к этим клеткам, вызывал деградацию N-белка. Была определена начальная скорость деградации N-белка в клетках, и показано, что она одинакова для клеток A431 и A549. Предложенные МНТ могут стать основой будущего противовирусного препарата, а сам подход к количественному анализу процесса деградации можно применить для анализа эффективности широкого класса препаратов, направленных на подавление активности различных вирусов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-14-00130). Авторы выражают благодарность Бунину Е. С. за помощь в выполнении вестерн-блоттинга и Сабурову А. С.

за помощь в выделении белков. Эксперименты были выполнены с использованием оборудования Центра коллективного пользования ИБГ РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Surjit M., Lal S.K.* // *Infect Genet Evol.* 2008. V. 8. P. 397–405.
2. *Wu C., Zheng M.* // *Preprints.* 2020. 2020020247.
3. *Prajapat M., Sarma P., Shekhar N., et al.* // *Indian J Pharmacol.* 2020. V. 52. P. 56.
4. *Liao H.-I., Olson C.A., Hwang S., et al.* // *J Biol Chem.* 2009. V. 284. P. 17512–17520.
5. *Shipunova V.O., Deyev S.M.* // *Acta Naturae.* 2022. V. 14. № 1(52). P. 54–72.
6. *Du Y., Zhang T., Meng X., et al.* // *Preprints.* 2020. DOI:10.21203/rs.3.rs-25828/v1.
7. *Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Lupanova T.N., et al.* // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2023. V. 510. P. 87–90.
8. *Lu M., Liu T., Jiao Q., et al.* // *Eur J Med Chem.* 2018. V. 146. P. 251–259.
9. *Fulcher L.J., Hutchinson L.D., Macartney T.J. et al.* // *Open biology.* 2017. V. 7. 170066.
10. *Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Khramtsov Y.V., et al.* // *Drug Des Devel Ther.* 2017. V. 11. P. 1315–1334.
11. *Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., et al.* // *Pharmaceutics.* 2023. V. 15, 324.
12. *Klionsky D.J., Abdel-Aziz A.K., Abdelfatah S., et al.* // *Autophagy.* 2021. V. 17. № 1. P. 1–382.

QUANTITATIVE DESCRIPTION OF THE N-PROTEIN OF THE SARS-COV-2 VIRUS DEGRADATION IN CELLS STABLY EXPRESSING IT UNDER THE INFLUENCE OF NEW MODULAR NANOTRANSPORTERS.

Y. V. Khramtsov^a, A. V. Ulasova^a, T. N. Lupanova^a, Academician of the RAS G. P. Georgiev^a,
Corresponding Member of the RAS A. S. Sobolev^{a, b, #}

^a*Institute of Gene Biology, RAS, Moscow, Russian Federation*

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

[#]*E-mail: alsobolev@yandex.ru*

Two eukaryotic cell lines, A549 and A431, were obtained with stable expression of the nucleocapsid protein (N-protein) of the SARS-CoV-2 virus fused with the red fluorescent protein mRuby3. Using microscopy, the volumes of the cytoplasm and nucleus were determined for these cells. Using quantitative immunoblotting techniques, the concentrations of the N-mRuby3 fusion protein in their cytoplasm were assessed. They were 19 and 9 μM for A549 and A431 cells, respectively. Using these concentrations, the initial rate of N-protein degradation in the studied cells was estimated from the decrease in cell fluorescence. In A549 and A431 cells it turned out to be the same and equal to 84 nM per hour. The approach of quantitatively describing the degradation process can be applied to analyze the effectiveness of a wide class of antiviral drugs that cause degradation of viral proteins.

Keywords: nucleocapsid protein, SARS-CoV-2, immunoblotting, cell sizes, intracellular concentrations, targeted protein degradation.

УДК 577.214, 577.22, 575.224

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАТОРОВ СТРУКТУРЫ ХРОМАТИНА НА ТРАНС-ДЕЙСТВУЮЩИЙ ГЕТЕРОХРОМАТИНОВЫЙ ЭФФЕКТ ПОЛОЖЕНИЯ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2024 г. А. А. Солодовников, С. А. Лавров*, А. С. Шацких, академик РАН В. А. Гвоздев

Поступило 15.12.2023 г.

После доработки 30.12.2023 г.

Принято к публикации 02.01.2024 г.

Гетерохроматиновый эффект положения проявляется в инактивации эухроматиновых генов при перемещении к гетерохроматину. При хромосомных перестройках инактивации подвергаются гены, расположенные рядом с новой эу-гетерохроматиновой границей в перестройке (цис-инактивация), и, в редких случаях, гены участка нормальной хромосомы, гомологичного району эу-гетерохроматиновой границы хромосомы с перестройкой (транс-инактивация). Инверсия *In(2)A4* способна транс-инактивировать расположенный на нормальной хромосоме ген-репортер *UAS-eGFP*. Мы провели нокдаун ряда белков хроматина при помощи регулируемой температурой РНК-интерференции и исследовали влияние нокдауна на транс-инактивацию репортера. Выявлено подавление транс-инактивации при нокдауне *Su(var)2-HP2* — белка, связывающегося с ключевым белком гетерохроматина *HP1a*, *SAYP* — субъединицы комплекса ремоделирования хроматина и метилтрансферазы гистонов *Eggless (SETDB1)*, вносящей узнаваемую белком *HP1a* модификацию *H3K9me3*. Представленный в работе способ исследования эффектов нокдауна генов на гетерохроматиновый эффект положения представляет самостоятельный методологический интерес.

Ключевые слова: эффект положения, структура хроматина, транс-инактивация, репортерные гены, РНК-интерференция, фазовая сепарация.

DOI: 10.31857/S2686738924020065, **EDN:** WFPXGE

ВВЕДЕНИЕ

Гетерохроматиновый эффект положения (ЭП) приводит к изменениям структуры хроматина (гетерохроматинизации) и нарушениям экспрессии эухроматиновых генов при переносе к гетерохроматину. Хромосомная инверсия *In(2)A4* (далее — *A4*) вызывает ЭП генов, расположенных рядом с новыми эу-гетерохроматиновыми границам (цис-инактивация), а также репортерных трансгенов, расположенных на гомологичной неперестроенной хромосоме (транс-инактивация) [1].

При цис-инактивации репрессия вызывается изменениями структуры хроматина, распространяющимися от гетерохроматина путем линейной самосборки комплекса белков и модификаций гистонов, включающего белок *HP1a*, узнающий вносимую метилтрансферазой *Su(var)3-9* модифика-

цию гистона *H3K9me2/3* [2]. Транс-действующий эффект положения приводит к изменениям структуры хроматина и инактивации генов нормальной хромосомы в гетерозиготе с перестройкой. Предполагается, что транс-инактивация возникает в результате затягивания района нормальной хромосомы в гетерохроматиновый компартмент (область конденсированного хроматина внутри ядра с высокой концентрацией белков гетерохроматина) за счет соматической конъюгации гомологов [1, 3–5]). Транс-инактивация предполагает образование гетерохроматина *de novo*, ее молекулярные механизмы должны отличаться от цис-инактивации [1, 6], обзоры см. [2, 7, 8]. Различие механизмов цис- и транс-инактивации предполагает наличие факторов, влияющих только на транс-инактивацию. Такие факторы были обнаружены в ходе анализа эффектов мутаций генов-модификаторов ЭП на вызываемую *A4* транс-инактивацию репортерного гена *mini-white* [1]. Мутации модификаторов ЭП *Su(var)2-5 (HP1a)*, *Eggless (SETDB1)*, *Su(var)3-1 (JIL-1)*,

Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: slavrov.defy@gmail.com

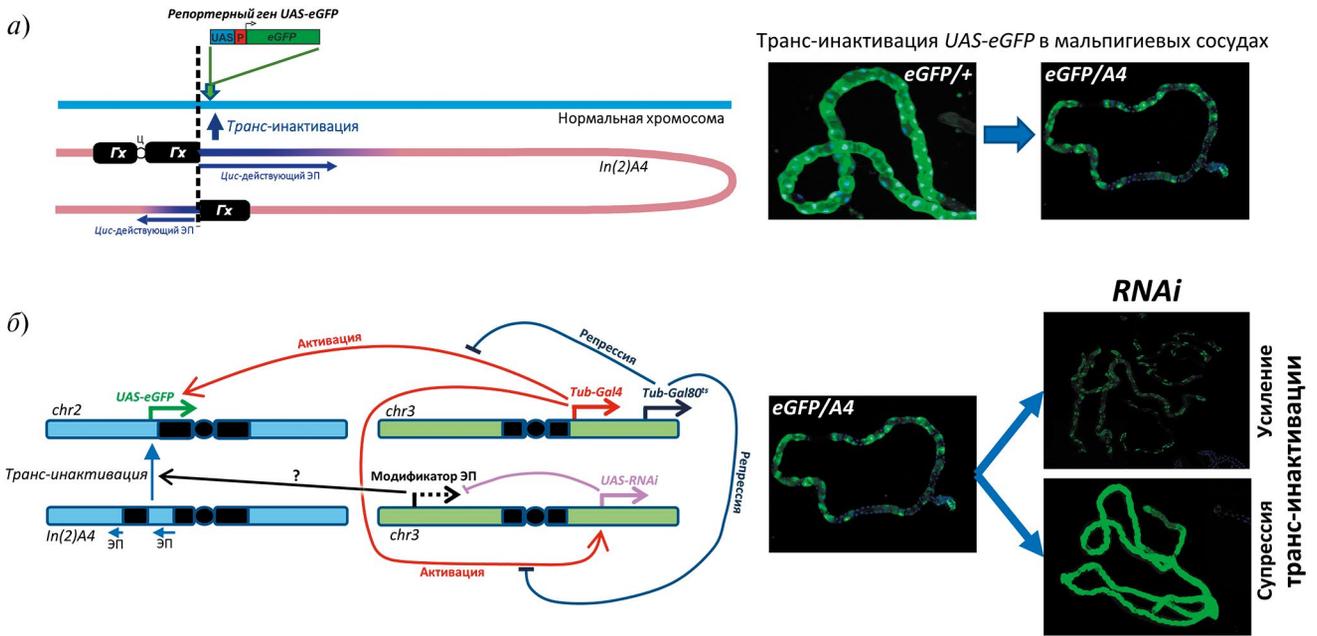


Рис. 1. Система для исследования влияния нокдауна генов – модификаторов эффекта положения на транс-инактивацию репортера *UAS-eGFP*, вызываемую инверсией *In(2)A4*: инверсия *In(2)A4* вызывает мозаичную инактивацию репортера *UAS-eGFP* на нормальной хромосоме в мальпигиевых сосудах. Показано положение репортера *UAS-eGFP* на нормальной хромосоме относительно места разрыва *A4* (пунктирная вертикальная линия). Ниже представлена структура инверсии *A4*, *Gx* – блоки гетерохроматина, в *A4* блок разделен на большой и отделенный малый фрагменты *ц* – центромера. Цис-действующий эффект положения распространяется на эухроматин от основного и отделенного блоков гетерохроматина (синие стрелки), транс-инактивация влияет на репортер в гомологичной нормальной хромосоме. На фотографиях показана мозаичная экспрессия *eGFP* (отсутствие флуоресценции в отдельных клетках) при вызываемой *In(2)A4* транс-инактивации (*eGFP/A4*), по сравнению с экспрессией *eGFP* при той же температуре, но на фоне хромосомы дикого типа (*eGFP/+*) (а); система для исследования нокдауна генов – модификаторов ЭП на транс-инактивацию (б). Генотип содержит: хромосомы 2 – инверсия *A4* в гетерозиготе с нормальной хромосомой с транс-инактивируемым репортером *UAS-eGFP*; хромосомы 3 – хромосома с генами *GAL4* и *GAL80* под тубулиновыми промоторами в гетерозиготе с хромосомой, содержащей трансген *UAS-RNAi* – источник дцРНК к одному из исследуемых генов-модификаторов (*egg*, *SAYP*, *Su(var)2-HP2*, *XNP*, *CG2116*, *E(var)3-9* и *Polybromo*). *GAL4* активирует транскрипцию *UAS-eGFP*, а также *UAS-RNAi*, вызывая нокдаун модификатора ЭП. *GAL80* инактивирует *GAL4*, подавляя транскрипцию с *UAS*-зависимых промоторов, при этом степень подавления снижается при повышении температуры. Нокдаун модификатора ЭП может выражаться в усилении или подавлении транс-инактивации (иллюстрации эффектов приведены на фото справа).

Su(var)3-6 (*Pp1-87B*), *Su(var)3-7* подавляли цис- и транс-инактивацию, тогда как мутации в гене *SAYP*, кодирующем субъединицу комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF, и в гене *Ago2*, компоненте системы РНК-интерференции и белке хроматина, специфически влияли на транс- но не на цис-инактивацию [1]. Метилтрансфераза гистонов *Su(var)3-9*, один из основных компонентов гетерохроматина, не влияла заметно на вызываемые *A4* цис- и транс-инактивацию [1].

Ранее было показано [9, 10], что ген *eGFP* под контролем элемента *UAS* (*UAS-eGFP*), расположенный на нормальной хромосоме в области, гомологичной району эу-гетерохроматиновой границы *A4*, транс-инактивируется в гетерозиготе с *A4*. Транс-инактивация *UAS-eGFP* в мальпигиевых сосудах имеет характерный для ЭП мозаичный характер (происходит только в части клеток, в дру-

гих сохраняется активность гена). Влияние уровня экспрессии *UAS-eGFP* на разных стадиях развития на степень его транс-инактивации было исследовано при помощи комбинации активатора *GAL4* и его термочувствительного репрессора *GAL80* [11]. Обнаружено, что высокий уровень транскрипции репортера на стадии эмбриона препятствует транс-инактивации на более поздних стадиях развития [9].

Для проверки роли ряда компонентов хроматина в транс-активации мы измерили степень репрессии гена-репортера *UAS-eGFP* под влиянием *A4* на фоне нокдауна генов потенциальных модификаторов ЭП: *SAYP*, *eggless*, *Polybromo*, *XNP*, *CG2116*, *E(var)3-9* и *Su(var)2-HP2*. Гены *SAYP* и *eggless* были выбраны для исследования, так как уже имелись данные об участии продуктов этих генов в транс-инактивации гена-репортера *mini-white* [1]. *Polybromo* и *SAYP* входят в ремоделирующий хро-

матин комплекс семейства *SWI/SNF*, белок Xnp/ (dATRX) является АТФ-хеликазой, компонентом другого комплекса ремоделирования хроматина и взаимодействует с *HP1a* [12], *CG2116* является транскрипционным фактором, компонентом меж-дисков, а гены *E(var)3-9* и *Su(var)2-HP2* известны как модификаторы ЭП. *E(var)3-9* – энхансер (необходим для противодействия гетерохроматиновой репрессии), *Su(var)2-HP2* – супрессор, структурный компонент гетерохроматина.

Нокдаун исследуемых генов осуществляли при помощи *GAL4*-зависимых трансгенных конструкций *UAS-RNAi*, производящих двуцепочечную РНК к гену-мишени, и комбинации *GAL4* и *GAL80^s*. Результаты нокдаунов показали участие в установлении транс-инактивации продуктов генов *SAYP*, *Su(var)2-HP2* и метилтрансферазы гистонов *eggless*. *Polybromo* и *E(var)3-9* участвуют в нормальной транскрипции *UAS-eGFP*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Методы классической генетики. Культивирование, отбор и скрещивания мух проводили по стандартным протоколам.

Линии мух. Следующие линии мух были использованы для скрещиваний:

w^{67c23}; *In(2)A4/CyO* содержит вызывающую транс-инактивацию хромосомную инверсию *In(2)A4* (далее – *A4*), получена в ОМГК ИМГ РАН [1].

*w**; *UAS-eGFP/CyO*; *P{tub-GAL4}LL7*; *P{tubP-GAL80ts}7/TM3 Sb¹ Ser¹*; содержит ген-репортер *eGFP* под контролем регуляторного элемента *UAS (UAS-eGFP)* в положении *chr2L:21195077* (релиз генома дрозофилы *R6*) на хромосоме 2, а также гены *GAL4* и *GAL80^s* под контролем промоторов тубулина на хромосоме 3. Создание линии, равно как и исследование транс-инактивации *UAS-eGFP* в мальпигиевых сосудах под влиянием *In(2)A4*, описано ранее [9, 10].

Линии, несущие *UAS-RNAi* для нокдаунов потенциальных генов – модификаторов транс-инактивации (*egg*, *SAYP*, *Su(var)2-HP2*, *XNP*, *CG2116*, *E(var)3-9* и *Polybromo*) были получены из коллекции Transgenic RNAi Project (TRiP, <https://fgr.hms.harvard.edu/fly-in-vivo-rnai>). *UAS-RNAi* в составе трансгенов *VALIUM10* или *VALIUM2* расположен на хромосоме 3 (сайт встраивания *attP2*). Информация о линиях представлена на рис. 1 и 2.

Регулируемый нокдаун генов-модификаторов эффекта положения. Были получены мухи, содержащие: репортер *UAS-eGFP* на хромосоме 2 в гетерозиготе с *In(2)A4* (опыт) или с нормальной хромосомой (контроль); хромосому 3 с генами *GAL4* и *GAL80^s* в гетерозиготе с хромосо-

мой, несущей трансген *UAS-RNAi* (Рис. 1б, 2а). Комбинация в одном геноме *GAL4* и его термочувствительного репрессора *GAL80^s* позволяет менять экспрессию генов под контролем *UAS* путем изменения температуры. *GAL80^s* полностью активен при 18 °С, денатурирует при 30 °С, в интервале 18–30 °С проявляет промежуточную активность [9, 10]. Сила нокдауна исследуемого гена пропорциональна уровню экспрессии *UAS-RNAi*, максимальна при 30 °С и минимальна при 18 °С. Так как сильный нокдаун имел летальный эффект, была подобрана температура, при которой нокдаун максимален, но мухи сохраняли жизнеспособность до взрослой стадии. При температуре 24 °С количество мРНК генов-модификаторов снижалось примерно в 2 раза, и наблюдалась выраженная транс-инактивация [9]. Схемы скрещиваний для получения нужных генотипов приведены на рис. 2а, информация о генах-модификаторах и эффектах нокдауна при разных температурах на жизнеспособность мух – на рис. 2б.

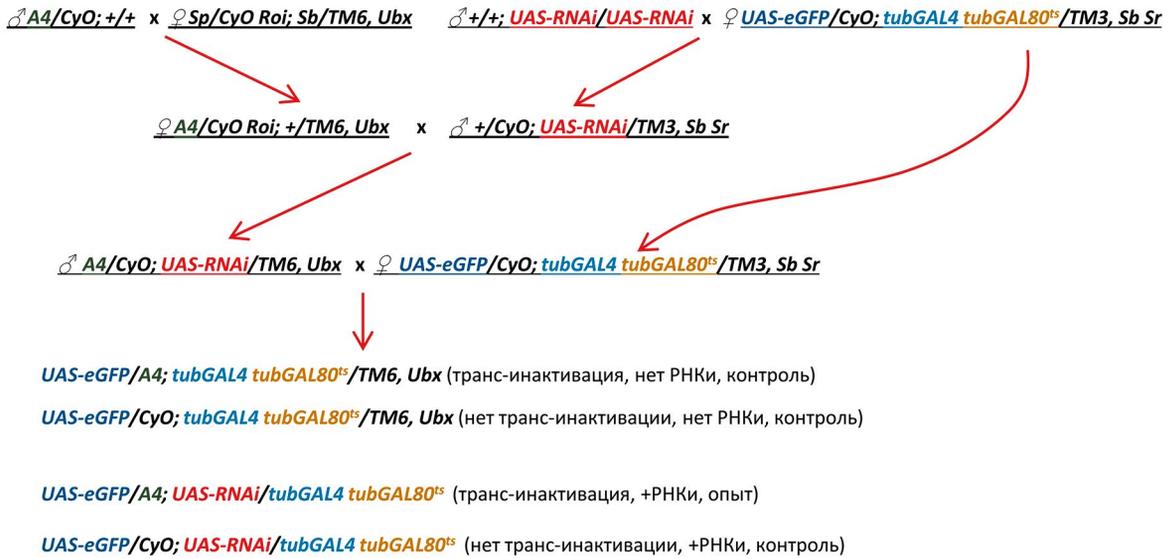
Измерение уровня экспрессии *eGFP* в мальпигиевых сосудах. В мальпигиевых сосудах мозаичный ЭП хорошо выражен, а морфология ткани (крупные изолированные клетки, формирующие однослойные трубки) облегчает количественные измерения. Флуоресценцию *eGFP* измеряли в отдельных клетках мальпигиевых сосудов двухдневных мух, развивавшихся при 24 °С. Измерения проводили, как описано в [9]. Для каждого изображения мальпигиевого сосуда было получено 50–200 записей измерений флуоресценции *eGFP*, соответствующих отдельным клеткам. Данные были использованы для построения графиков распределений интенсивности флуоресценции *eGFP* и подсчета статистики в программах MS Excel и Knime (<https://www.knime.com>). В приложении Knime была создана последовательность обработки данных, состоящая из загрузки исходных измерений, удаления выбросов, построения скрипичных диаграмм и получения базовой статистики. Результаты получены для 2–4 экспериментов.

Оценку количества мРНК репортера *UAS-eGFP* проводили также при помощи количественной ПЦР. Данные количественной ПЦР коррелировали с данными по флуоресценции, хотя разницы по мРНК между генотипами оказалась ниже (не представлено). Прямое сравнение уровня флуоресценции *eGFP* и количества его мРНК затруднено, так как: 1) флуоресценцию измеряли в мальпигиевых сосудах, а мРНК выделяли из целых мух; 2) использованный способ определения относительных количеств мРНК *eGFP* (относительно мРНК *Rpl32*) не позволяет учесть возможные изменения экспрессии *Rpl32* на фоне нокдауна.

Измерение содержания мРНК методом количественной ПЦР. РНК выделяли из взрослых мух возрастом 2 дня с использованием реактива Trizol, проводили обратную транскрипцию и количественную ПЦР. Относительные количества мРНК

репортерного гена *eGFP* и генов-модификаторов определяли на ПЦР-амплификаторе с детекцией в реальном времени ДТ-96 (ДНК-технология) методом ΔCq относительно количества мРНК гена рибосомального белка *Rpl32*. Расчет относительных

a)



б)

Ген-мишень	ID линии TRIP	Комментарий	Выживаемость при повышении температуры (степени нокдауна)			
			18°C	20°C	24°C	29°C
<i>CG2116</i>	26712	Транскрипционный фактор. Связывается с междисками политенных хромосом	ЛКВ	ЛКВ	ЛКВ	ЛКВ
<i>E(var)3-9</i>	31948	Связывается с промоторами. Взаимодействует с HP1a	ЛКВ	ЛКВ	ЛКВ	ЛКВ
<i>eggless</i>	34803	SETDB1. Метилтрансфераза гистона H3 в положении K9	ЛКВ	ЛКВ	ЛКВ	ЛК
<i>Polybromo</i>	32346	Компонент комплекса Brahma	ЛКВ	ЛКВ	ЛКВ	ЛКВ
<i>SAYP</i>	32840	Компонент комплекса Brahma, влияет на транс-инактивацию	ЛКВ	ЛКВ	ЛКВ	ЛК
<i>Su(var)2-HP2</i>	25972	Хроматиновый белок, взаимодействует с HP1a	ЛКВ	ЛКВ	ЛКВ	Л
<i>XNP/ATRX</i>	32894	Хеликаза, взаимодействующая с HP1a. Формирование гетерохроматина	ЛКВ	ЛКВ	ЛКВ(♂)	ЛК

Рис. 2. Схема скрещиваний для получения генотипов, использованных для исследования эффектов нокдаунов компонентов хроматина на транс-инактивацию, таблица исследуемых генов и влияние нокдауна разной степени на жизнеспособность мух: ход скрещиваний и использованные в работе генотипы. Получены четыре генотипа, представляющие все возможные комбинации “наличие – отсутствие транс-инактивации” и “наличие – отсутствие нокдауна”. Во всех генотипах присутствуют гены *GAL4* и *GAL80^{ts}*. Отношение флуоресценции репортера в *eGFP/A4* к *eGFP/+* без *UAS-RNAi* (*UAS-eGFP/A4; tubGAL4 tubGAL80^{ts}/TM6* к *UAS-eGFP/CyO; tubGAL4 tubGAL80^{ts}/TM6*) показывает уровень транс-инактивации без нокдауна гена-модификатора. Отношение флуоресценции репортера в *eGFP/A4; UAS-RNAi* к *eGFP/+; UAS-RNAi* (*UAS-eGFP/A4; tubGAL4 tubGAL80^{ts}/UAS-RNAi* к *UAS-eGFP/CyO; tubGAL4 tubGAL80^{ts}/UAS-RNAi*) показывает уровень транс-инактивации при нокдауне исследуемого гена. Отношение уровней транс-инактивации “нокдаун/без нокдауна” определяет степень влияния гена-модификатора на транс-инактивацию (a); влияние нокдауна исследуемых генов на жизнеспособность особей. Степень нокдауна увеличивается при повышении температуры, когда инактивация репрессора *GAL80^{ts}* повышает концентрацию активного *GAL4*). Стадии развития обозначены как Л (личинка), К (куколка), В (взрослые). Соответственно, ЛКВ обозначает выживаемость на всех стадиях при данной температуре, ЛК – выживают личинки и куколки, Л – только личинки. В случае нокдауна *XNP* выжидали самцы (б).

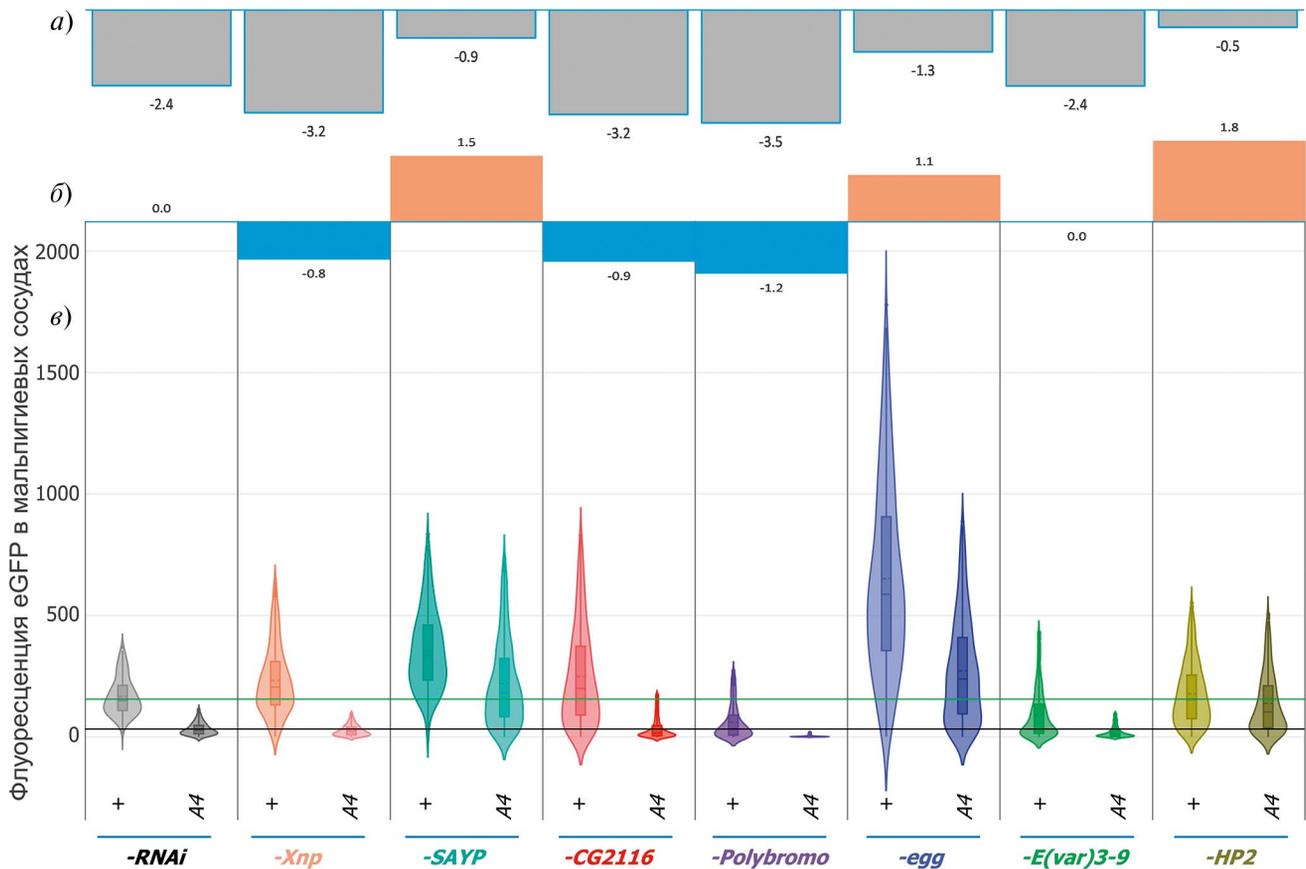


Рис 3. Парное сравнение интенсивности флуоресценции клеток мальпигиевых сосудов у мух с *UAS-eGFP* в норме и при транс-инактивации без нокдауна (*-RNAi*) и при нокдауне одного из белков (*-Xnp*, *-SAYP*, *-CG2116*, *-olybromo*, *-eggless*, *-E(var)3-9*, *-HP2*).

количество мРНК проводили в программе RealTime PCR от производителя прибора и Excel. Протокол выделения подробно описан в [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные измерений транс-инактивации на фоне нокдаунов белков хроматина представлены на рис. 3.

Пары слева направо (подписи внизу рисунка): отсутствие нокдауна (*-RNAi*), нокдаун одного из хроматиновых белков (остальные столбцы, указан выключаемый ген). В каждой паре (+) – норма (нет транс-инактивации), (*A4*) – транс-инактивация. Гистограмма, показывающая степень транс-инактивации репортера (а). Степень транс-инактивации рассчитана как Log_2 отношения медианной интенсивности флуоресценции в *UAS-eGFP/A4* (*A4*) к *UAS-eGFP/+* (+), для контроля без нокдауна (*-RNAi*) флуоресценция снижена в ~ 6 раз. Гистограмма, показывающая влияние нокдауна на транс-инактивацию (б). Влияние нокдауна рассчитывается как Log_2 отношения степени транс-инактивации при нокдауне к степени транс-инактивации в кон-

троле (*-RNAi*). Положительные значения (оранжевые столбики) означают подавление транс-инактивации (уменьшение репрессии репортера), отрицательные (синие столбики) – усиление. В случае нокдауна *Su(var)2-HP2* транс-инактивация ослабевает в ~ 3.5 раза. Скрипичные диаграммы, показывающие распределение интенсивностей флуоресценции в мальпигиевых сосудах (в). Графики показывают симметрично отраженную кривую распределения результатов измерений, внутри кривой – “ящик с усами”, диаграмма с квартилями и выбросами, для тех же измерений. Ось у – интенсивность флуоресценции в условных единицах. Зеленая линия – медианное значение интенсивности флуоресценции для контроля (*UAS-eGFP/+*; без нокдауна и транс-инактивации), черная линия – медианное значение интенсивности флуоресценции при транс-инактивации без нокдауна. На графиках видно: транс-инактивацию (столбик *-RNAi*, разница между + и *A4*), влияние нокдауна на нормальную транскрипцию репортера (увеличение экспрессии в образцах без транс-инактивации (+) в *-SAYP*, *-egg* и снижение в *-Polybromo* и *-E(var)3-9*) и влияние нокдауна на степень транс-

инактивации (изменения отношения $A4$ к + внутри столбца). Нокдауны *SAYP*, *Eggless* и *HP2* заметно снижают транс-инактивацию, тогда как нокдауны *Xnp*, *CG2116* и *Polybromo* ее слабо усиливают. Нокдаун *E(var)3-9* на транс-инактивацию не влиял

Обнаружено, что нокдауны генов *CG2116* (кодирует белок междисков политенных хромосом) и *XNP* (последний отвечает за поддержание стабильности центромер и теломер, правильную локализацию *HP1a* и встраивание в хроматин вариантного гистона H3.3) не оказывают заметного влияния на степень транс-инактивации репортера или на уровень его экспрессии в целом.

Нокдаун метилтрансферазы *Eggless/SETDB1* приводит к подавлению транс-инактивации *UAS-eGFP*, аналогично ранее описанному подавлению транс-инактивации *mini-white* под влиянием $A4$ при мутации в *eggless* [1]. Интересно, что метилтрансфераза *Su(var)3-9* не влияла на репрессию репортера *mini-white* в той же системе [1]. *Eggless*, как и *Su(var)3-9*, вносит репрессорную модификацию H3K9me3 и, возможно, в случае $A4$ *Eggless* функционально заменяет *Su(var)3-9*. Нокдаун *Eggless* также приводит к повышению уровня экспрессии *UAS-eGFP* в норме (без влияния $A4$), это указывает на роль *Eggless* в контроле нормальной транскрипции *UAS-eGFP*.

Любопытным представляется результат нокдауна *Polybromo* и *SAYP*: оба белка являются субъединицами комплекса ремоделирования хроматина *PBAP* (один из *SWI/SNF* комплексов) и физически взаимодействуют между собой [13-15]. Комплексы ремоделирования (ремоделеры), при их склонности к сохранению консервативной архитектуры из нескольких субъединиц, также описываемых как консервативные, в действительности достаточно разнообразны функционально. Некоторые из них формируют хроматин промоторов генов [14], но все они объединяются в одно большое семейство ремоделеров *SWI/SNF*. На примере элегантного и детального исследования ремоделера млекопитающих *cBAF* семейства *SWI/SNF* было обнаружено, что его субъединицы представляют собой белки, несущие районы протяженных *IDR* [16], склонных к формированию белок-белковых взаимодействий. Работа продемонстрировала роль *IDRs* в ремоделировании хроматина. При этом онкогенные факторы часто представляют собой мутантные варианты субъединиц *cBAF*. Нокдаун *Polybromo* не оказывает достоверного влияния на транс-инактивацию (но вызывает снижение экспрессии репортера в опыте и контроле, что указывает на участие белка в активации транскрипции *UAS-eGFP* в норме), а нокдаун *SAYP* вызывает сильное подавление транс-инактивации. Видимо, *SAYP* имеет отдельную функцию в установлении гетерохроматиновой репрессии, реализуемую независимо от *Polybromo*. Нокдаун *SAYP*

также вызывал дерепрессию *UAS-eGFP* в норме, это указывает на роль *SAYP* в формировании репрессированного эухроматина.

Нокдаун *Su(var)2-HP2* подавляет транс-инактивацию репортера примерно в той же степени, что и *SAYP*. Белок *Su(var)2-HP2* взаимодействует с ключевым белком гетерохроматина HP1a, который рассматривается как определяющий компактизацию гетерохроматина по механизму фазовой сепарации с участием белков с районами функционально важных неупорядоченных аминокислотных последовательностей (*IDRs*) [17-19]. В настоящее время механизмы фазовой сепарации рассматриваются как регуляторные при образования разнообразных субклеточных компартментов, необходимых для обеспечения важнейших биологических процессов, перечисление которых можно найти в обзорах [18], осуществляемых с участием функционально важных *IDRs* [20].

Таким образом, среди исследованных генов *Su(var)2-HP2*, *SAYP* и *eggless* необходимы для транс-действующей гетерохроматиновой репрессии. Полученные данные согласуются с ранее имеющейся информацией о роли *SAYP* в транс-инактивации репортеров *mini-white* в паре с $A4$ [1], тем самым указывая на *SAYP* как универсальный компонент транс-инактивации. Роль *Su(var)2-HP2* в процессе ранее не была известна. Участие белков *Su(var)2-HP2* и *SAYP* в процессе транс-инактивации обнаруживает роль в этом явлении белков, содержащих *IDRs*, и механизмов фазовой сепарации.

Перспективы. Использованный в работе подход может быть применен для исследования роли любых хроматиновых белков в эктопической гетерохроматинизации эухроматина, для этого требуется наличие источника дцРНК к интересующему гену под контролем *UAS* на хромосоме 3. Комбинация *GAL4-GAL80^{ts}* позволяет путем изменения температуры, осуществлять нокдаун интересующего гена на любой стадии развития и тем самым исследовать, на каком этапе онтогенеза необходима функция продукта изучаемого гена.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность А. Ю. Коневу за ценные замечания.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Часть работы, связанная с морфологическим анализом флуоресцентных изображений, была выполнена при финансовой поддержке Российского

научного Фонда (грант № 19-74-20178-П). Часть работы, связанная с генетическими исследованиями выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00382-П).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

В соответствии с пунктом 3 главы 1 Директивы 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г. о защите животных, используемых в научных целях, требования биоэтики не распространяются на объект данного исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abramov Y.A., Shatskikh A.S., Maksimenko O.G., et al.* The Differences Between Cis- and Trans-Gene Inactivation Caused by Heterochromatin in *Drosophila* // *Genetics*, 2016, Т. 202 №. 1, С. 93–106.
2. *Elgin S.C., Reuter G.* Position-effect variegation, heterochromatin formation, and gene silencing in *Drosophila* // *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, Т. 5 №. 8, С. a017780.
3. *Sass G.L., Henikoff S.* Pairing-dependent mislocalization of a *Drosophila* brown gene reporter to a heterochromatic environment // *Genetics*, 1999, Т. 152 №. 2, С. 595–604.
4. *Sage B.T., Csink A.K.* Heterochromatic self-association, a determinant of nuclear organization, does not require sequence homology in *Drosophila* // *Genetics*, 2003, Т. 165 №. 3, С. 1183–1193.
5. *Shatskikh A.S., Abramov Y.A., Lavrov S.A.* Trans-inactivation: Repression in a wrong place // *Fly (Austin)*, 2017, Т. 11 №. 2, С. 96–103.
6. *Nisha P., Plank J.L., Csink A.K.* Analysis of chromatin structure of genes silenced by heterochromatin in trans // *Genetics*, 2008, Т. 179 №. 1, С. 359–373.
7. *Politz J.C., Scalzo D., Groudine M.* Something silent this way forms: the functional organization of the repressive nuclear compartment // *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2013, Т. 29, С. 241–270.
8. *Grewal S.I.S.* The molecular basis of heterochromatin assembly and epigenetic inheritance // *Mol Cell*, 2023, Т. 83 №. 11, С. 1767–1785.
9. *Солодовников А.А., Гвоздев В.А., Лавров С.А.* Высокий уровень транскрипции гена на стадии эмбриона приводит к подавлению его гетерохроматиновой транс-инактивации у взрослых особей *Drosophila melanogaster* // *Биохимия*, 2020, Т. 85 №. 4, С. 547–555.
10. *Шацких А.С., Оленкина О.М., Солодовников А.А. и др.* Системы регулируемой экспрессии генов как инструмент исследования гетерохроматинового эффекта положения у *Drosophila melanogaster* // *Биохимия*, 2018, Т. 83 №. 5, С. 712–723.
11. *Fujimoto E., Gaynes B., Brimley C.J., et al.* Gal80 inter-sectional regulation of cell-type specific expression in vertebrates // *Dev Dyn*, 2011, Т. 240 №. 10, С. 2324–2334.
12. *Meyer-Nava S., Torres A., Zurita M., et al.* Molecular effects of dADD1 misexpression in chromatin organization and transcription // *BMC Mol Cell Biol*, 2020, Т. 21 №. 1, С. 17.
13. *Nakayama T., Shimajima T., Hirose S.* The PBAP remodeling complex is required for histone H3.3 replacement at chromatin boundaries and for boundary functions // *Development*, 2012, Т. 139 №. 24, С. 4582–4590.
14. *Shidlovskii Y.V., Bylino O.V., Shaposhnikov A.V., et al.* Subunits of the PBAP Chromatin Remodeler Are Capable of Mediating Enhancer-Driven Transcription in *Drosophila* // *Int J Mol Sci*, 2021, Т. 22 №. 6.
15. *Chalkley G.E., Moshkin Y.M., Langenberg K., et al.* The transcriptional coactivator SAYP is a trithorax group signature subunit of the PBAP chromatin remodeling complex // *Mol Cell Biol*, 2008, Т. 28 №. 9, С. 2920–2929.
16. *Patil A., Strom A.R., Paulo J.A., et al.* A disordered region controls cBAF activity via condensation and partner recruitment // *Cell*, 2023, Т. 186 №. 22, С. 4936–4955 e4926.
17. *Keenen M.M., Brown D., Brennan L.D., et al.* HP1 proteins compact DNA into mechanically and positionally stable phase separated domains // *Elife*, 2021, Т. 10.
18. *Babu M.M.* The contribution of intrinsically disordered regions to protein function, cellular complexity, and human disease // *Biochem Soc Trans*, 2016, Т. 44 №. 5, С. 1185–1200.
19. *Cermakova K., Hodges H.C.* Interaction modules that impart specificity to disordered protein // *Trends Biochem Sci*, 2023, Т. 48 №. 5, С. 477–490.
20. *Banerjee P.R., Holehouse A.S., Kriwacki R., et al.* Dissecting the biophysics and biology of intrinsically disordered proteins // *Trends Biochem Sci*, 2023.

**EFFECT OF CHROMATIN STRUCTURE MODIFIERS
ON THE TRANS-ACTING HETEROCHROMATIN POSITION
EFFECT IN *DROSOPHILA MELANOGASTER***

A. A. Solodovnikov, S. A. Lavrov[#], A. S. Shatskikh, Academician of the RAS V. A. Gvozdev

National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, Russian Federation

[#]E-mail: slavrov.defy@gmail.com

The heterochromatin position effect is manifested in the inactivation of euchromatin genes transferred to heterochromatin. In chromosomal rearrangements, genes located near the new eu-heterochromatin boundary in the rearrangement (cis-inactivation) and, in rare cases, genes of a region of the normal chromosome homologous to the region of the eu-heterochromatin boundary of the chromosome with the rearrangement (trans-inactivation) are subject to inactivation. The *In(2)A4* inversion is able to trans-inactivate the *UAS-eGFP* reporter gene located on the normal chromosome. We knockdown a number of chromatin proteins using temperature-controlled RNA interference and investigated the effect of knockdown on trans-inactivation of the reporter. We found suppression of trans-inactivation by knockdowns of *Su(var)2-HP2*, a protein that binds to the key heterochromatin protein *HP1a*, *SAYP*, a subunit of the chromatin remodelling complex, and *Eggless* histone methyltransferase (*SETDB1*), which introduces a *H3K9me3* histone mark, recognized by the *HP1a* protein. The method of studying the effects of gene knockdown on heterochromatin position effects presented in this work is of independent methodological interest.

Keywords: position effect variegation, chromatin structure, trans-inactivation, reporter genes, RNA interference, phase separation.

УДК 577.21

мРНК *PRPF19* КОДИРУЕТ МАЛУЮ ОТКРЫТУЮ РАМКУ СЧИТЫВАНИЯ, КОТОРАЯ ВАЖНА ДЛЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. Н. М. Шепелев^{1, 2}, А. О. Курочкина²,
академик РАН О. А. Донцова^{1, 2, 3, 4}, М. П. Рубцова^{1, 2, *}

Поступило 18.12.2023 г.

После доработки 25.12.2023 г.

Принято к публикации 28.12.2023 г.

Высокопроизводительное рибосомное профилирование продемонстрировало трансляцию тысяч малых открытых рамок считывания, расположенных в 5'-нетранслируемых областях матричных РНК (вышележащих ОРС). Вышележащая ОРС может как выполнять регуляторную функцию за счет влияния на трансляцию нижележащей основной ОРС, так и кодировать малый функциональный белок или микробелок. В данной работе мы показали, что 5'-нетранслируемая область мРНК *PRPF19* содержит вышележащую ОРС, которая транслируется в клетках человека. Инактивация данной вышележащей ОРС снижает жизнеспособность клеток человека.

Ключевые слова: рибосомное профилирование, вышележащая ОРС, вОРС, микробелок, микропептид.

DOI: 10.31857/S2686738924020079, **EDN:** WFODRJ

ВВЕДЕНИЕ

Изобретение метода высокопроизводительного рибосомного профилирования позволило обнаружить трансляцию множества молекул РНК, а также участков матричных РНК (мРНК), которые прежде считались некодирующими [1]. Последующие исследования раскрыли важную роль многих продуктов трансляции “некодирующих” РНК [2–4]. Интересным примером “некодирующих” участков мРНК являются малые открытые рамки считывания (малые ОРС), расположенные в их 5'-нетранслируемой области (5'-НТО). Далее мы будем называть их вышележащие ОРС по аналогии с upstream ORF или uORF в англоязычной литературе [1]. Особенность функционирования вышележащих ОРС заключается в том, что они могут как регулировать экспрессию гена, влияя на трансляцию нижележащей основной ОРС гена, так и кодировать

малые функциональные белки, роль которых может быть напрямую не связана с функцией кодируемого геном белка [5, 6].

Одним из известных генов, содержащих регуляторные вышележащие ОРС, является *ATF4*, кодирующий главный фактор транскрипции, необходимый для восстановления клеток в условиях стресса [7]. мРНК гена *ATF4* обладает двумя вышележащими ОРС, консервативными среди млекопитающих, которые подавляют трансляцию основной ОРС в нормальных условиях, но при этом способствуют ее трансляции при различных стрессах [8].

Интересный пример вышележащей ОРС расположен в гене *ASNSD1*, вовлеченном в биосинтез аспарагина. Данная вышележащая ОРС кодирует малый белок *ASDURF* [9]. *ASDURF* является одной из 12 субъединиц кошаперонного комплекса PAQ-сомы [9], который вовлечен в биогенез ряда белковых комплексов [10].

В работах по полногеномному скринингу генов человека при помощи системы *CRISPR-Cas9*, выявлен ген *PRPF19*, который критически необходим для жизнеспособности клеток различных линий [11, 12]. Белок *PRPF19* представляет собой высококонсервативный фактор сплайсинга, который включен в состав комплекса *Prp19/NTC* [13]. Основную функцию этого комплекса связывают с процессингом РНК и ответом на повреждение

¹Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

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

³Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского, Москва, Россия

⁴Сколковский институт науки и технологий, центр молекулярной и клеточной биологии, Москва, Россия

*E-mail: mprubtsova@gmail.com

ДНК [13]. В данной работе, чтобы выяснить роль вышележащей ОРС в мРНК гена *PRPF19* мы проверили, может ли транслироваться в клетках данная вышележащая ОРС при помощи репортерной конструкции, и изучили, как ее инактивация влияет на жизнеспособность клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры клеток. Клетки *HEK293T* (производная линия из почки эмбриона человека) и *HAP1* (практически гаплоидная производная линия из хронического миелолейкоза человека) растили в среде *DMEM/F12* и *IMDM* соответственно (Gibco) с добавлением аланил-глутамин (GlutaMAX, Gibco), 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки (FBS, Gibco) в присутствии 100 единиц/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco) при 37 °C в атмосфере 5% CO₂. Конфлюентность культур исследовали с помощью инвертированного микроскопа. Клетки были проверены на отсутствие микоплазмы (MycroReport, «Евроген»).

Клетки трансфицировали согласно протоколу производителя, используя набор Lipofectamine 3000 Transfection Reagent (Invitrogen). С помощью этого же набора получали лентивирусные частицы согласно примечанию по применению от производителя.

Для анализа конкуренции клетки трансдуцировали вирусными частицами, кодирующими геновую РНК/*Cas9* и ген зеленого флуоресцентного белка (*EGFP*), примерно с 50%-й эффективностью и оценивали процент выживших клеток с флуоресценцией *EGFP* на проточном цитометре MACSQuant Analyser (Miltenyi Biotec) в течение нескольких суток.

Быстрая амплификация 5'-концов кДНК (5'RACE) 5'RACE проводили согласно протоколу производителя (5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, version 2.0, Invitrogen). РНК выделяли из клеток *HEK293T* при помощи набора PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen). Для получения кДНК и последующей амплификации использовали олигонуклеотиды 5'-GTCTTCCCTCTTCTTGC-3' и 5'-GGTTAGCACAGTGGCTTTGTC-3' соответственно.

Плазмиды и конструкции. Плазида для проверки трансляции вышележащей ОРС сделана на основе вектора pHaloTag-*EGFP* (Addgene #86629), в котором последовательность HaloTag заменили на последовательность, соответствующую 5'-концу основной изоформы мРНК гена *PRPF19* со вставкой последовательности HiBiT перед стоп-кодоном вышележащей ОРС.

Плазида для внесения случайных мутаций с помощью *CRISPR-Cas9* сделана на основе вектора *LeGO-iG2* (Addgene #27341), в которую перед

SFFV промотором поместили последовательность из вектора *lentiGuide-Puro* (Addgene #52963) от U6-промотора до остова геновой РНК с терминатором транскрипции. Направляющую последовательность геновой РНК клонировали в полученный вектор путем отжига олигонуклеотидов и их лигирования в вектор после рестрикции *BsmBI*. Использовали следующие олигонуклеотиды: 5'-CACCGCTACGCTAGCATCGCTCGGC-3' и 5'-AAACGCCGAGCGATGCTAGCGTAGC-3', 5'-CACCGAGCGCTACGCTAGCATCGCT-3' и 5'-AAACAGCGATGCTAGCGTAGCGCTC-3' для вышележащей ОРС *PRPF19*; 5'-CACCGCGCGACTCAACCTAGTC-3' и 5'-AAACGACTAGGTTGAGTCGTCGCGC-3' для отрицательного контроля; 5'-CACCGATACGTGCAAATTCACCAGA-3' и 5'-AAACTCTGGTGAATTTGCACGTATC-3', 5'-CACCGTGGCCAGGTTGCGGTCGCAG-3' и 5'-AAACCTGCGACCGCAACCTGGCCAC-3' для положительных контролей (на ген *PCNA*).

Детекция люциферазной активности, опосредованной HiBiT. Для детекции активности люциферазы, образующейся при связывании большой субъединицы люциферазы *LgBiT* и пептида *HiBiT*, использовали набор Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System (Promega) в 96-луночном формате согласно протоколу производителя. Интенсивность люминесценции (RLU) каждого образца определяли с помощью Victor X5 plate reader (Perkin Elmer).

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, США). Статистическую значимость определяли с помощью *t*-теста не менее чем для трех повторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно базе данных Ensemble основной изоформой мРНК гена *PRPF19* является ENST00000227524. Простым способом выявления ОРС в РНК является анализ интересующей последовательности при помощи транскриптомного браузера Trips-Viz [14], который позволяет визуализировать данные рибосомного профилирования. Используя Trips-Viz, можно распределить совокупные данные рибосомного профилирования из разных исследований по трем возможным рамкам считывания.

Чтобы оценить, с какими участками основной изоформы мРНК гена *PRPF19* связаны транслирующие рибосомы (рис. 1), мы выбрали в Trips-Viz режим однозначного отнесения прочтений из рибосомного профилирования, таким образом, все отображенные данные должны относиться только к транскриптам гена *PRPF19*.

Мы обнаружили, что помимо аннотированной основной ОРС в рамке считывания № 3, отмеченной синим (см. рис. 1), в 5'-НТО основной изоформы мРНК также присутствует отмеченный красным профиль, который относится к рамке считывания № 1 (см. рис. 1) и содержит только один стоп-кодон, который расположен в начале транскрипта. Все это свидетельствует о том, что в 5'-НТО мРНК гена *PRPF19* может транслироваться вышележащая ОРС. Интересно, что при этом в 5'-НТО отсутствует старт-кодон AUG, поэтому трансляция такой вышележащей ОРС должна начинаться с неканонического старт-кодона.

Чтобы подтвердить, что трансляция вышележащей ОРС гена *PRPF19* начинается с неканонического старт-кодона, мы выбрали только данные профилирования в Traps-Viz, полученные при остановке рибосом на стадии инициации трансляции в условиях обработки клеток харрингтонином или лактимидомицином (рис. 2).

Полученный суммарный профиль иницирующих рибосом из разных исследований показывает, что трансляция вышележащей ОРС может начинаться с нескольких старт-кодонов. Красные пики в области 5'-НТО мРНК на графике соответствуют кодонам CUG, GUG, AUC, которые близки к AUG и могут выступать в качестве старт-кодонов при инициации трансляции [15].

Вероятность трансляции вышележащей ОРС в мРНК гена *PRPF19* высока, о чем свидетельствует

сопоставимое и даже большее содержание рибосом, особенно иницирующих на ней, в сравнении с основной ОРС. Для этого мы подтвердили, что в клетках человека *HAP1* присутствует только одна изоформа мРНК гена *PRPF19*. Для этого мы получили кДНК, используя два олигонуклеотида, комплементарные 7 и 8 экзонам *PRPF19*, и провели анализ изоформ мРНК гена *PRPF19* методом 5'RACE. Экзоны 7 и 8 содержатся во всех аннотированных в Ensemble транскриптах гена *PRPF19*, которые содержат хотя бы часть первого экзона основной изоформы, где расположена предполагаемая вышележащая ОРС. Мы смогли обнаружить только последовательность, которая полностью соответствует основной изоформе мРНК гена *PRPF19* из Ensemble. Таким образом, данные рибосомного профилирования могут относиться только к одной мРНК гена *PRPF19*.

Перед изучением вышележащей ОРС необходимо подтвердить, что она действительно транслируется. С этой целью мы поместили последовательность, соответствующую 5'-концу мРНК гена *PRPF19*, включая начало ОРС белка PRPF19, перед ОРС зеленого флуоресцентного белка (*EGFP*). В данной репортерной конструкции мы добавили на С-конец предполагаемого пептида последовательность белковой метки *HiBiT*, состоящую из 11 аминокислот (рис. 3А). *HiBiT* позволяет детектировать наличие пептида в образце за счет люминесценции, которая возникает при комплементации неактивной субъединицы люциферазы *LgBiT*

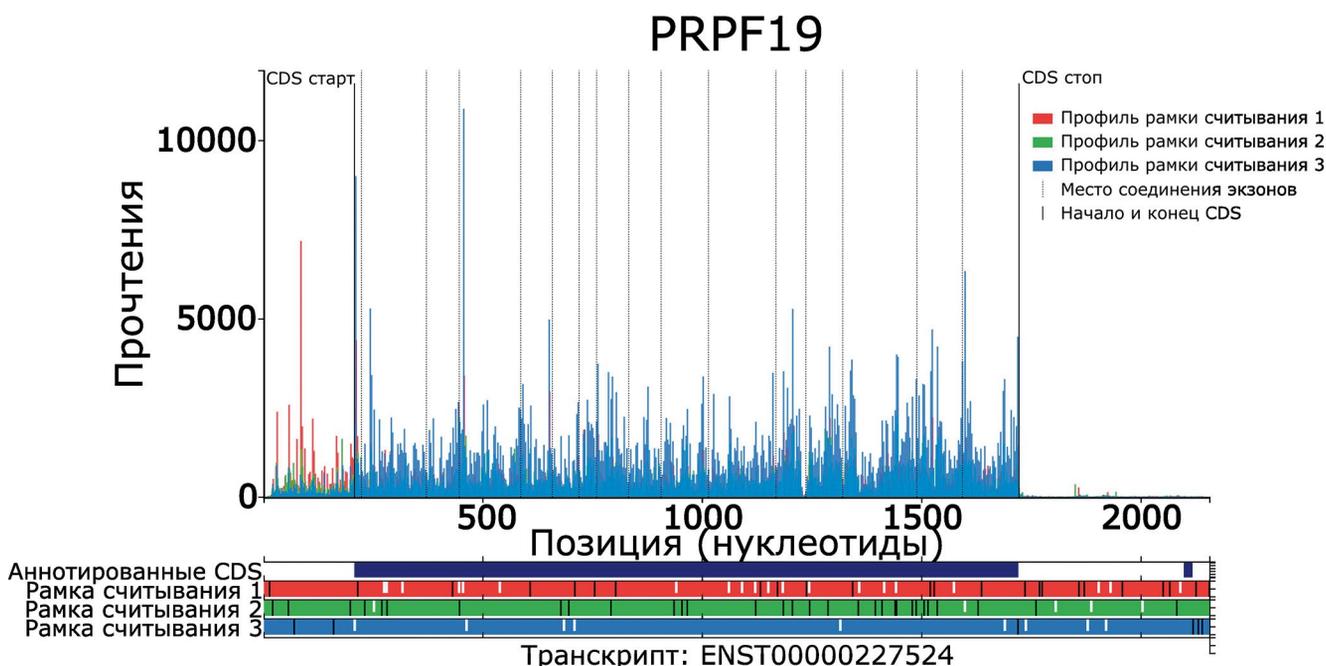


Рис. 1. Рибосомное профилирование основной изоформы мРНК гена *PRPF19* человека (ENST00000227524) согласно базе Ensemble, отображенное в транскриптном браузере Traps-Viz. На схеме внизу отмечены разными цветами три возможные рамки считывания и соответствующие им профили на графике. На схеме рамок считывания черным отмечены стоп-кодоны (UGA, UAA, UAG), белым отмечены старт-кодоны (AUG).

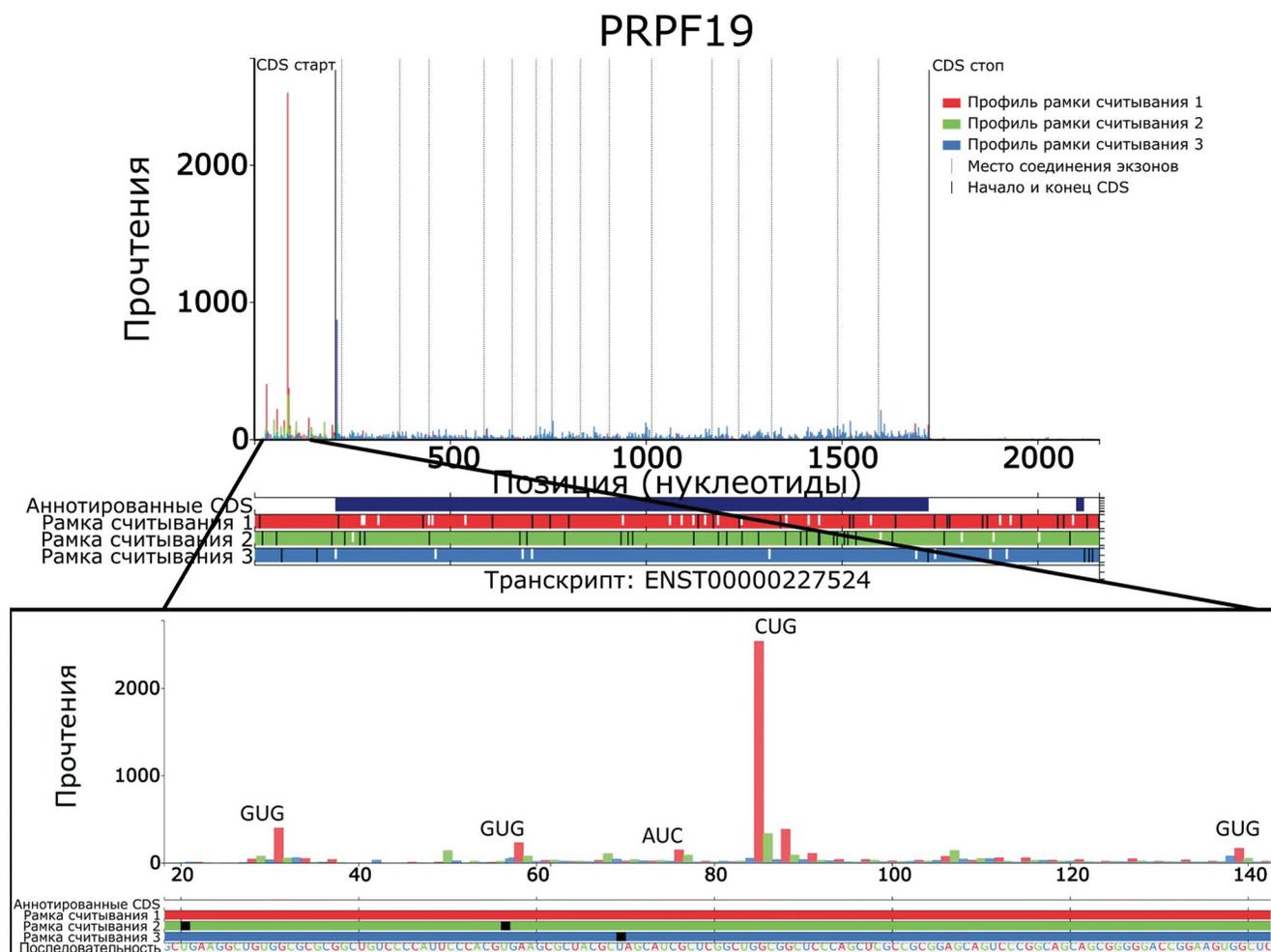


Рис. 2. Профилирование инициирующих рибосом основной изоформы мРНК гена *PRPF19* человека (ENST00000227524) согласно базе Ensemble, отображенное в транскриптомном браузере Trips-Viz. На схеме разными цветами отмечены три возможные рамки считывания и соответствующие им профили на графике. На схеме внизу черным отмечены стоп-кодоны (UGA, UAA, UAG), белым отмечены старт-кодоны (AUG).

меткой *HiBiT*. В качестве контрольной конструкции использовали исходный вектор без вставки последовательности 5'-конца мРНК гена *PRPF19*. Мы трансфицировали клетки *HEK293T* полученными конструкциями и измерили люциферазную активность, опосредованную *HiBiT* (см. рис. 3Б). Сигнал люминесценции в лизатах клеток, трансфицированных репортерной конструкцией, примерно в 120 раз превышал фоновый сигнал, наблюдаемый в лизатах клеток, трансфицированных контрольной конструкцией (см. рис. 3Б). Таким образом, мы показали, что вышележащая ОРС в 5'-НТО мРНК гена *PRPF19* может транслироваться в клетках человека *in vitro*.

Таким образом, мы подтвердили трансляцию вышележащей ОРС в мРНК гена *PRPF19* человека. Мы решили проверить, кодирует ли эта ОРС малый белок. Функциональность продукта трансляции можно косвенно оценить, определив консервативность кодирующей его ОРС. Для этого

мы выбрали первый предполагаемый старт-кодон как начало ОРС у человека и выровняли последовательности вышележащей ОРС среди млекопитающих в геномном браузере CodAlignView [16] (рис. 4А).

Мы обнаружили, что вышележащая ОРС в мРНК гена *PRPF19* высококонсервативна среди многих млекопитающих, тем не менее присутствует ряд несинонимичных замен, а также вставок и делеций, которые должны приводить к замене аминокислот в белковом продукте (см. рис. 4А). При этом многие потенциальные старт-кодоны неконсервативны (рис. 4А), что указывает на возможную эволюционную пластичность в инициации трансляции данной вышележащей ОРС. Поэтому мы выровняли последовательности кодируемого ей белка среди некоторых млекопитающих (см. рис. 4Б). Мы обнаружили, что рассмотренный белок в целом умеренно консервативен среди млекопитающих, однако он более консервативен в С-кон-

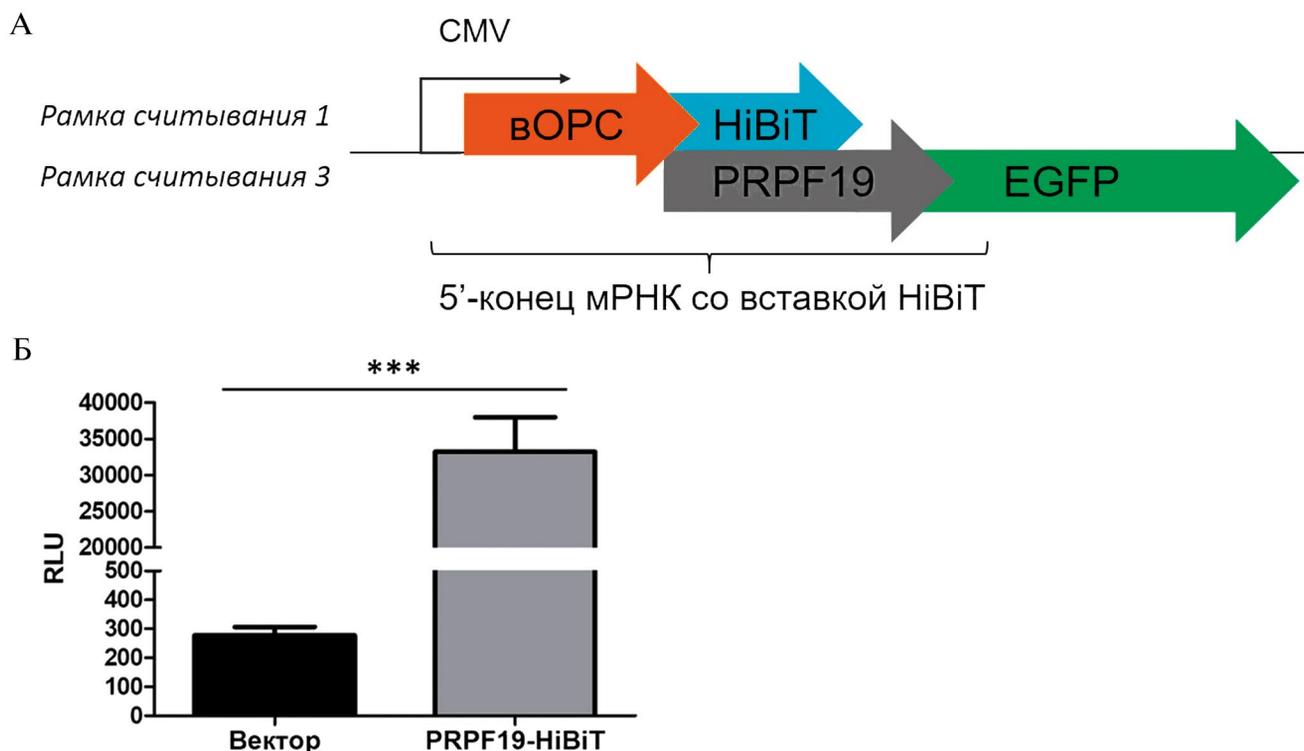


Рис. 3. Подтверждение трансляции вышележащей OPC гена *PRPF19* с помощью репортерной конструкции: схема репортерной конструкции. Часть OPC белка *PRPF19* соединена с OPC *EGFP*. воРС – вышележащая OPC (А); измерение люциферазной активности, опосредованной HiBiT, в лизатах клеток после трансфекции репортерными конструкциями. Показаны средние значения и стандартные отклонения для 4 независимых трансфекций. RLU – относительные световые единицы; *** – *p*-значение < 0.001 (Б).

цевой части. Таким образом, данная малая OPC и кодируемый ей белок могут быть важны для жизнеспособности клетки.

Далее мы оценили, влияют ли мутации в последовательности данной вышележащей OPC на жизнеспособность клетки. Для этого мы выбрали две наиболее специфичные гидовые РНК, нацеленные на середину вышележащей OPC, так что расстояние от старта транскрипции или от начала основной OPC гена *PRPF19* до ближайшего места разрезания составляло 71 и 128 нуклеотидов соответственно, и использовали их для внесения случайных мутаций с помощью системы CRISPR-Cas9. Таким образом, возникающие мутации не должны влиять на транскрипцию гена *PRPF19* или трансляцию основной OPC, но будут инактивировать вышележащую OPC при сдвиге рамки считывания. Мы провели эксперимент по анализу конкуренции между клетками дикого типа и клетками с набором образующихся случайных мутаций в вышележащей OPC при экспрессии гидовой РНК (рис. 5). В качестве положительного контроля использовали гидовые РНК, нацеленные на ген *PCNA*, который необходим для репликации ДНК, а в качестве отрицательного – гидовую РНК, не имеющую комплементарного участка в геноме.

Мы обнаружили, что экспрессия гидовых РНК, инактивирующих вышележащую OPC в *PRPF19*, но не контрольной гидовой РНК, снижает жизнеспособность клеток (см. рис. 5).

Полученные в работе данные указывают на то, что вышележащая OPC в мРНК гена *PRPF19* может транслироваться в клетках человека *in vitro*. При этом кодируемый ею малый белок консервативен среди млекопитающих. Мутации в вышележащей OPC приводят к снижению жизнеспособности клеток человека. Таким образом, либо потеря малого белка, либо нарушение регуляторной активности вышележащей OPC приводит к снижению жизнеспособности клеток человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, 5'-нетранслируемая область мРНК гена *PRPF19* содержит вышележащую OPC, которая транслируется в клетках человека *in vitro*, как было показано с использованием репортерной конструкции. Инактивация данной вышележащей OPC снижает жизнеспособность клеток человека. Консервативность белка, кодируемого вышележащей OPC в мРНК гена *PRPF19*, среди млекопитающих указывает на то, что именно он может быть необходим для



Рис. 4. Анализ консервативности вышележащей OPC гена *PRPF19* среди млекопитающих: выравнивание вышележащей OPC гена *PRPF19* в геномном браузере *CodAlignView* среди некоторых млекопитающих. Указаны положения первого старт-кодона вышележащей OPC у человека по данным на рис. 2 и стоп-кодона (А); Выравнивание последовательностей белков, кодируемых вышележащей OPC в мРНК гена *PRPF19*, среди указанных видов в *MSA4U* [17]often encoding so-called leader peptides. Начало белка выбрано по первому возможному старт-кодону в соответствующей рамке считывания (Б).

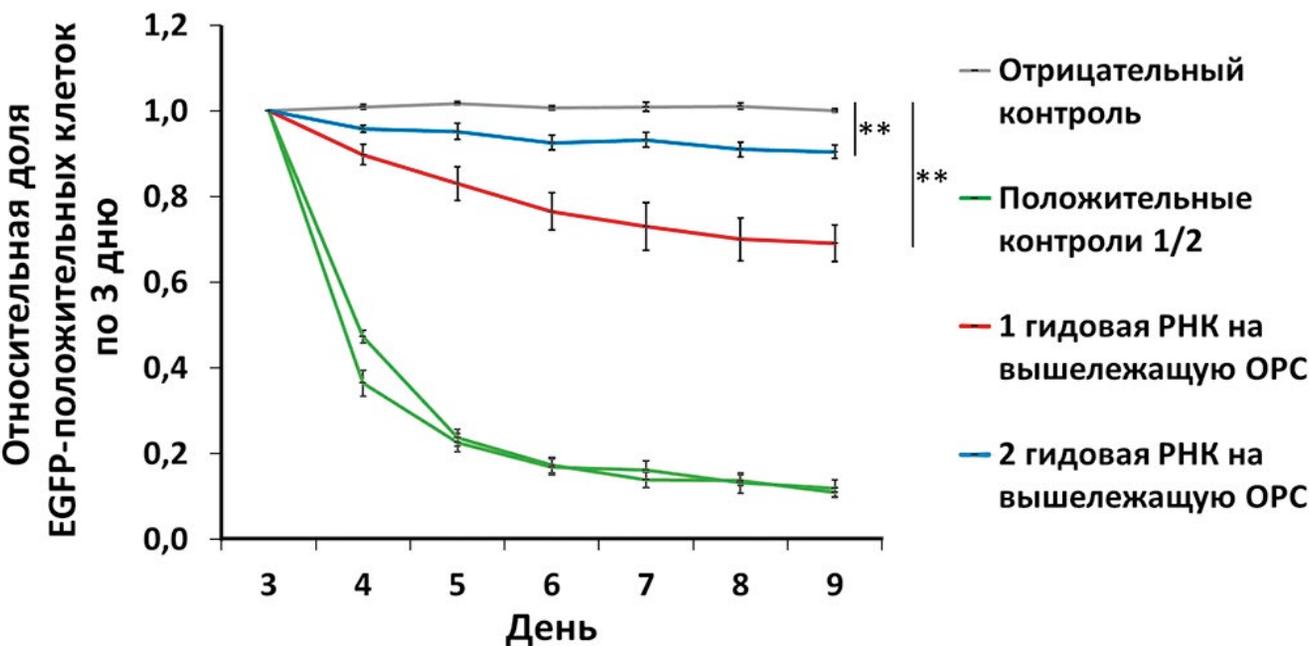


Рис. 5. Анализ конкуренции между клетками HAP1 дикого типа и клетками, экспрессирующими гидовые РНК, в течение нескольких дней. Показана относительная доля клеток, экспрессирующих гидовую РНК и EGFP, по третьему дню после трансдукции лентивирусами. Показаны средние значения и стандартное отклонение для трех независимых заражений клеток. ** – р-значение < 0.01. “вОРС” – вышележащая OPC.

жизнеспособности клетки. В то же время нельзя исключить, что данная вышележащая ОРС регулирует трансляцию основной ОРС, и содержание белка *PRPF19* в клетке соответственно. Регуляторная роль вышележащей ОРС в мРНК гена *PRPF19* также может иметь значение для жизнеспособности клетки.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов у авторов отсутствует.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность Программе развития МГУ ПНР-5 за предоставление доступа к проточному цитометру MACSQuant Analyser, планшетному мультиридеру Victor X5 plate reader и капиллярному секвенатору SeqStudio.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-14-00058).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Brar G. A., Weissman J. S.* Ribosome profiling reveals the what, when, where and how of protein synthesis // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015. V. 16. № 11. P. 651–664.
2. *Rubtsova M., Naraykina Y., Vasilkova D., et al.* Protein encoded in human telomerase RNA is involved in cell protective pathways // *Nucleic Acids Research.* 2018. V. 46, № 17. P. 8966–8977.
3. *Chugunova A., Loseva E., Mazin P., et al.* *LINC00116* codes for a mitochondrial peptide linking respiration and lipid metabolism // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2019. V. 116, № 11. P. 4940–4945.
4. *Sergiev P.V., Rubtsova M.P.* Little but Loud. The Diversity of Functions of Small Proteins and Peptides – Translational Products of Short Reading Frames // *Biochemistry Moscow.* 2021. V. 86, № 9. P. 1139–1150.
5. *Wethmar K.* The regulatory potential of upstream open reading frames in eukaryotic gene expression // *WIREs RNA.* 2014. V. 5, № 6. P. 765–768.
6. *Renz P.F., Valdivia-Francia F., Sandoel A.* Some like it translated: small ORFs in the 5'UTR // *Experimental Cell Research.* 2020. V. 396, № 1. P. 112229.
7. *Ameri K., Harris A.L.* Activating transcription factor 4 // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2008. V. 40, № 1. P. 14–21.
8. *Vattem K.M., Wek R.C.* Reinitiation involving upstream ORFs regulates *ATF4* mRNA translation in mammalian cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004. V. 101, № 31. P. 11269–11274.
9. *Cloutier P., Poitras C., Faubert D., et al.* Upstream ORF-Encoded ASDURF Is a Novel Prefoldin-like Subunit of the PAQosome // *J. Proteome Res.* 2020. V. 19, № 1. P. 18–27.
10. *Pinard M., Cloutier P., Poitras C., et al.* Unphosphorylated Form of the PAQosome Core Subunit RPAP3 Binds Ribosomal Preassembly Complexes to Modulate Ribosome Biogenesis // *J. Proteome Res.* 2022. V. 21, № 4. P. 1073–1082.
11. *Meyers R. M., Bryan J. G., McFarland J. M., et al.* Computational correction of copy number effect improves specificity of CRISPR–Cas9 essentiality screens in cancer cells // *Nat Genet.* 2017. V. 49, № 12. P. 1779–1784.
12. *Behan F. M., Iorio F., Picco G., et al.* Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR–Cas9 screens // *Nature.* 2019. V. 568, № 7753. P. 511–516.
13. *Yin J., Zhu J.-M., Shen X.-Z.* New insights into pre-mRNA processing factor 19: A multi-faceted protein in humans // *Biology of the Cell.* 2012. V. 104, № 12. P. 695–705.
14. *Kiniry S. J., O'Connor P.B.F., Michel A. M., et al.* Trips-Viz: a transcriptome browser for exploring Ribo-Seq data // *Nucleic Acids Research.* 2019. V. 47, № D1. P. D847–D852.
15. *Cao X., Slavoff S.A.* Non-AUG start codons: Expanding and regulating the small and alternative ORFeome // *Experimental Cell Research.* 2020. V. 391, № 1. P. 111973.
16. *Jungreis, I., Lin, M. F., Chan, C. S., et al.* CodAlignView: A tool for visualizing protein-coding constraint. 2016.
17. *Egorov A. A., Atkinson G. C.* uORF4u: a tool for annotation of conserved upstream open reading frames // *Bioinformatics.* 2023. V. 39, № 5. P. btad323.

***PRPF19* mRNA ENCODES A SMALL OPEN READING FRAME THAT IS IMPORTANT FOR VIABILITY OF HUMAN CELLS**

**N. M. Shepelev^{a, b}, A. O. Kurochkina^b, Academician of the RAS O. A. Dontsova^{a, b, c, d},
M. P. Rubtsova^{a, b, #}**

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

^b*Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, Russian Federation*

^c*A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow, Russian Federation*

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

[#]*E-mail: mprubtsova@gmail.com*

High-throughput ribosome profiling demonstrated the translation of thousands small open reading frames located in the 5' untranslated regions of messenger RNAs (upstream ORFs). Upstream ORF can both perform a regulatory function by influencing the translation of the downstream main ORF, and encode a small functional protein or microprotein. In this work, we showed that the 5' untranslated region of the *PRPF19* mRNA encodes an upstream ORF that is translated in human cells. Inactivation of this upstream ORF reduces the viability of human cells.

Keywords: ribosome profiling, upstream ORF, uORF, microprotein, micropeptide.

УДК 577.2

МОДУЛЬНЫЕ НАНОТРАНСПОРТЕРЫ, СПОСОБНЫЕ ВЫЗЫВАТЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ ДЕГРАДАЦИЮ N-БЕЛКА ВИРУСА SARS-COV-2 В КЛЕТКАХ A549 С ВРЕМЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ЭТОГО БЕЛКА, СЛИТОГО С ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ БЕЛКОМ *MRUBY3*

© 2024 г. Ю. В. Храмцов¹, А. В. Уласов¹, Т. Н. Лупанова¹, академик РАН Г. П. Георгиев¹, член-корреспондент РАН А. С. Соболев^{1,2,*}

Поступило 30.11.2023 г.

После доработки 15.12.2023 г.

Принято к публикации 18.12.2023 г.

Созданы модульные нанотранспортеры (МНТ), содержащие антителоподобную молекулу, монободии, к N-белку вируса SARS-CoV-2, а также аминокислотную последовательность, привлекающую E3-лигазу Kear1 (E3BP). В данный МНТ также был введен сайт отщепления E3BP-монободии от МНТ в кислых эндоцитозных компартментах. Показано, что данное отщепление эндосомной протеазой катепсином В приводит к увеличению сродства E3BP-монободии к N-белку в 2.7 раза. На клетках A549 с временной экспрессией N-белка, слитого с флуоресцентным белком *mRuby3*, было показано, что инкубация с МНТ приводит к достоверному уменьшению флуоресценции *mRuby3*. Предполагается, что разработанные МНТ могут служить основой для создания новых противовирусных препаратов против вируса SARS-CoV-2.

Ключевые слова: нуклеокапсидный белок, SARS-CoV-2, проточная цитофлуориметрия, термофорез, катепсин В, E3-лигаза, Kear1.

DOI: 10.31857/S2686738924020085, **EDN:** WFGUMP

ВВЕДЕНИЕ

Необходимость в разработке новых противовирусных препаратов особенно ярко продемонстрировала пандемия коронавируса SARS-CoV-2. Наиболее часто используются низкомолекулярные ингибиторы вирусной активности [1]. Однако их можно подобрать не ко всем белковым мишеням, в отличие от антителоподобных молекул, которые можно получить к практически любому белковому антигену [2, 3]. Не удивительно, что в различных системах доставки биоактивных молекул все чаще используются разные антителоподобные молекулы [4]. Для вируса SARS-CoV-2 в качестве белка-мишени можно выбрать крайне необходимый для сборки вирусного капсида нуклеокапсидный белок, или N-белок [5–7]. К этому белку высокое сродство имеет полученная ранее антителоподобная молекула, монободии (NC2) [8]. Ранее мы раз-

работали модульные нанотранспортеры (МНТ), содержащие в своем составе данное монободии и способные связываться в клетках-мишенях с N-белком [9], в настоящей работе обозначаемые как МНТ₀. Следующий вариант МНТ, МНТ₁, отличался от МНТ₀ тем, что в него была дополнительно включена аминокислотная последовательность DPETGEYL (далее – E3BP), способная с высоким сродством связывать убиквитинлигазу Kear1 [10]. Мы предположили, что связывание МНТ₁ одновременно с Kear1 и N-белком будет приводить к деградации N-белка как следствие его убиквитинирования [11]. В состав МНТ₁, так же как и у МНТ₀, был внесен сайт для отщепления E3BP-монободии от МНТ₁ в закисляемых эндоцитозных компартментах. Настоящая работа посвящена как изучению взаимодействия МНТ₁ и расщепленного МНТ₁ с N-белком в растворе, так и влиянию МНТ₁ на содержание N-белка в клетках A549, временно экспрессирующих этот белок.

Наработку и очистку N-белка и МНТ₀ проводили, как это описано в [9]. Сайт-специфическим мутагенезом из МНТ, описанного ранее [9], получили ген, кодирующий МНТ следующего состава: affibody(EGFR)-HisTag-DTox-HMP-FKFL-E3BP-

¹Институт биологии гена Российской академии наук, Москва

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

*E-mail: alsobolev@yandex.ru

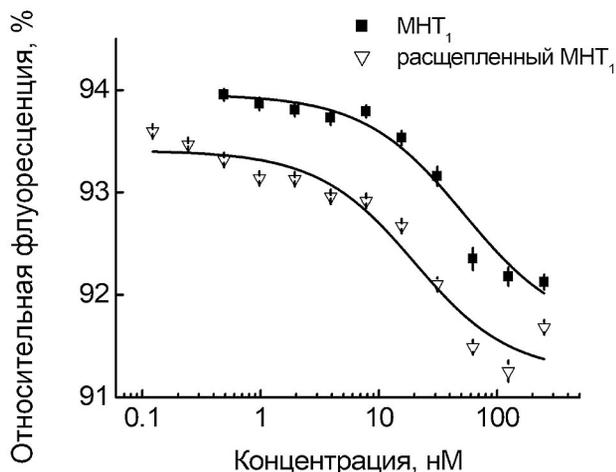


Рис. 1. Зависимости относительной интенсивности флуоресценции (за 100% принята интенсивность флуоресценции до начала термофореза) через 20 с после начала термофореза от концентрации МНТ₁ или расщепленного МНТ₁ при постоянной концентрации N-белка, меченного AF488 (5 нМ). Указана стандартная ошибка определения относительной интенсивности флуоресценции (14–17 повторов).

NC2, где affibody(EGFR) — аффибоди к рецептору эпидермального фактора роста, DTox — транслокационный домен дифтерийного токсина, НМР — гемоглобиноподобный белок *E. coli*, FKFL — сайт расщепления эндосомной протеазой катепсином В, ЕЗВР — аминокислотная последовательность, привлекающая Е3-лигазу Keap1 и NC2 — монободи к N-белку. Экспрессию МНТ₁ проводили в штамме *E. coli* Ros(DE3)pLysS. Автоиндукцию экспрессии МНТ₁ проводили инкубацией в течение 48 ч при 18 °С. МНТ₁ выделяли из растворимой фракции [12], а затем очищали аффинной хроматографией на носителе HisTrap FF (Cytiva). Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле продемонстрировал достаточную степень чистоты полученного МНТ₁ (86.6%).

Для получения расщепленного МНТ₁ инкубировали 4 мкМ МНТ₁ с 4 мкг/мл активированного катепсина В (Native human Cathepsin В protein (ab90387, Abcam)). Активацию катепсина В проводили, как описано в [14]. Расщепление МНТ₁ проводилось при рН 5.5 с добавлением 0.001% SDS, чтобы избежать агрегации МНТ₁. Взаимодействие МНТ₁ и расщепленного МНТ₁ с N-белком изучали так же, как описано в [13], методом термофореза на приборе Monolith NT.115 Series (NanoTemper Technologies GmbH, Германия) в буфере 10 мМ NaH₂PO₄, 150 мМ NaCl, рН 8.0. N-белок был помечен флуоресцентным красителем AF488, как это описано в [13] и с той же степенью модификации. Трансфекция клеток А549 плазмидой (3–4% трансфицированных клеток), кодирующей N-белок,

слитый с флуоресцентным белком *mRuby3*, осуществлялась по [13].

При фиксированной концентрации N-белка, меченного AF488, (5 нМ) методом термофореза были получены зависимости относительной флуоресценции (за 100% принята флуоресценция до начала термофореза) через 20 с после начала термофореза от концентрации МНТ₁ (рис. 1, квадраты) или расщепленного МНТ₁ (см. рис. 1, полые треугольники). Для каждого эксперимента получали три-четыре такие зависимости, и весь эксперимент повторяли три-четыре раза. По каждой кривой определяли константу диссоциации комплекса МНТ₁ или расщепленного МНТ₁ с N-белком, ее усредняли по всем 12–17 кривым и определяли относительную ошибку ее измерения. Константы диссоциации комплексов МНТ₁ или расщепленного МНТ₁ с N-белком составили 47 ± 3 и 17 ± 4 нМ соответственно. Для расщепленного МНТ₁ это значение близко к константе для свободного монободи NC2 (6.7 нМ [8]). Таким образом, расщепление МНТ₁ катепсином В приводит к увеличению его сродства к N-белку приблизительно в три раза.

За процессом деградации слитого белка N-*mRuby3* в клетках А549 с временной экспрессией данного белка наблюдали с использованием проточной цитофлуориметрии на приборе MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec, Франция) в канале флуоресценции 571–601 нм, флуоресценцию возбуждали лазером с длиной волны 561 нм. Клетки с временной экспрессией белка N-*mRuby3* инкубировали с 500 нМ МНТ₁ или МНТ₀ в течение заданного времени, отмывали, снимали с подложки и изучали в канале флуоресценции *mRuby3* на проточном цитофлуориметре. На рис. 2 показана зависимость флуоресценции клеток А549 от времени инкубации с МНТ₁ или МНТ₀. На 5 часов средняя флуоресценция клеток А549 достоверно ($p < 0.05$, U-критерий Манна Уитни) ниже в случае, когда клетки инкубировали с МНТ₁, по сравнению с инкубацией с МНТ₀. Уменьшение флуоресценции *mRuby3* можно связать с деградацией слитого белка N-*mRuby3*. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что включение в разработанные нами МНТ аминокислотной последовательности, привлекающей Е3-лигазу Keap1, может приводить к деградации N-белка в клетках-мишенях.

Как мы показали ранее, отщепление монободи от МНТ₀ приводит к существенному уменьшению константы диссоциации комплекса N-белка с этим монободи (с 116 ± 20 до 10 ± 3 нМ) [9]. В настоящей работе заметное увеличение сродства наблюдается и для МНТ₁ (константа диссоциации уменьшается с 47 ± 3 до 17 ± 4 нМ). Иными словами, отщепленный

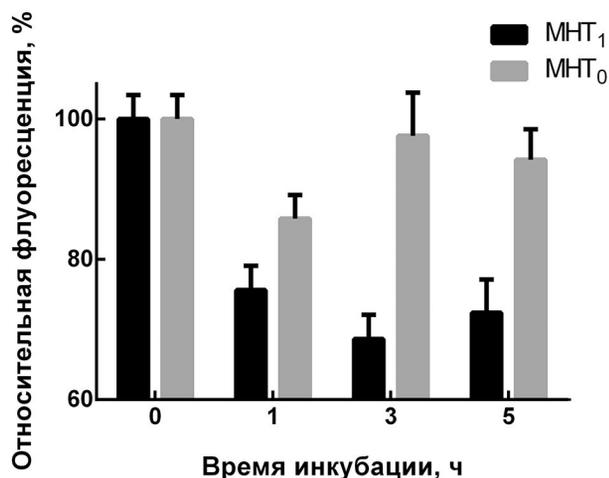


Рис. 2. Относительная флуоресценция клеток A549 (флуоресценция клеток, к которым не добавлялся МНТ была принята за 100%) при их инкубации различных временах с 500 нМ МНТ₁ или 500 нМ МНТ₀. Указаны средние значения с соответствующей среднеквадратичной ошибкой ($n = 3-9$).

фрагмент в клетке-мишени будет взаимодействовать с N-белком заметно лучше, чем полноразмерный МНТ. Известно, что конкурентное взаимодействие с N-белком потенциально способно нарушить весь процесс сборки новых вирусных частиц [15], а значит, подавить распространение вируса в организме. В настоящей работе на это воздействие на N-белок накладывается еще его вероятная деградация за счет привлечения к нему ЕЗ-лигазы, что, по нашему мнению, должно кардинально сказаться на сборке вирусного капсида.

Мы предполагаем, что разработанные МНТ могут послужить основой для создания новых противовирусных препаратов против вируса SARS-CoV-2. Причем примененный в данной работе подход в перспективе может оказаться эффективным против не только этого вируса, но и других вирусов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-14-00130). Эксперименты были выполнены с использованием

оборудования Центра коллективного пользования ИБГ РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clercq E.D., Li G. // Clin Microbiol Rev. 2016. V. 29. P. 695–747.
2. Gebauer M., Skerra A. // Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2020. V. 60. P. 391–415.
3. Shipunova V.O., Deyev S.M. // Acta Naturae. 2022. V. 14. № 1(52). P. 54–72.
4. Tolmachev V.M., Chernov V.I., Deyev S.M. // Russ Chem Rev. 2022. V. 91. № 3. RCR5034
5. Surjit M., Lal S.K. // Infect Genet Evol. 2008. V. 8. P. 397–405.
6. Wu C., Zheng M. // Preprints. 2020. 2020020247.
7. Prajapat M., Sarma P., Shekhar N., et al. // Indian J Pharmacol. 2020. V. 52. P. 56.
8. Du Y., Zhang T., Meng X., et al. // Preprints. 2020. DOI: 10.21203/rs.3.rs-25828/v1.
9. Khrantsov Y.V., Ulasov A.V., Lupanova T.N., et al. // Dokl Biochem Biophys. 2023. V. 510. P. 87–90.
10. Lu M., Liu T., Jiao Q. et al. // Eur J Med Chem. 2018. V. 146. P. 251–259.
11. Fulcher L.J., Hutchinson L.D., Macartney T.J., et al. // Open biology. 2017. V. 7. 170066.
12. Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Khrantsov Y.V., et al. // Drug Des Devel Ther. 2017. V. 11. P. 1315–1334.
13. Khrantsov Y.V., Ulasov A.V., Lupanova T.N., et al. // Dokl Biochem Biophys. 2022. V. 506.
14. Kern H.B., Srinivasan S., Convertine A.J., et al. // Mol Pharmaceutics. 2017. V. 14(5). P. 1450–1459.
15. Wang S., Dai T., Qin Z., et al. // Nat. Cell Biol. 2021. V. 23. P. 718–732.

MODULAR NANOTRANSPORTERS CAPABLE OF CAUSE INTRACELLULAR DEGRADATION OF THE N-PROTEIN OF THE SARS-COV-2 VIRUS IN A549 CELLS WITH TEMPORARY EXPRESSION OF THIS PROTEIN FUSED WITH THE FLUORESCENT PROTEIN *MRUBY3*

Y. V. Khramtsov^a, A. V. Ulasov^a, T. N. Lupanova^a, Academician of the RAS G. P. Georgiev^a,
Corresponding Member of the RAS A. S. Sobolev^{a, b, #}

^a *Institute of Gene Biology, RAS, Moscow, Russian Federation*

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

[#] *E-mail: alsobolev@yandex.ru*

Modular nanotransporters (MNTs) have been created containing an antibody-like molecule, monobody, to the N-protein of the SARS-CoV-2 virus, as well as an amino acid sequence that attracts the E3 ligase Keap1 (E3BP). This MNT also included a site for cleavage of the E3BP monobody from the MNT in acidic endocytic compartments. It was shown that this cleavage by the endosomal protease cathepsin B leads to a 2.7-fold increase in the affinity of the E3BP monobody for the N-protein. Using A549 cells with transient expression of the N-protein fused with the fluorescent protein mRuby3, it was shown that incubation with MNT leads to a significant decrease in *mRuby3* fluorescence. It is assumed that the developed MNTs can serve as the basis for the creation of new antiviral drugs against the SARS-CoV-2 virus.

Keywords: nucleocapsid protein, SARS-CoV-2, flow cytometry, thermophoresis, cathepsin B, E3 ligase, Keap1.

УДК 57.01

ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО СПИДРОИНА СТИМУЛИРУЮТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ И МИГРАЦИЮ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. О. И. Агапова¹, Д. С. Островский², М. Х. Хубецова², Т. З. Керимов^{2,3}, С. А. Борзенко^{2,3},
В. Г. Богуш⁴, Л. И. Давыдова⁴, С. Э. Чеперегин⁴, А. Е. Ефимов¹, И. И. Агапов^{1,*}, В. Г. Дебабов⁴

Поступило 09.11.2023 г.

После доработки 20.11.2023 г.

Принято к публикации 25.11.2023 г.

В данной статье представлены результаты изучения влияния гидрогеля из рекомбинантного спидроина на клетки переднего эпителия и кератоциты роговицы человека в эксперименте *in vitro*. Всемирная организация здравоохранения в своих исследованиях установила высокую распространенность травм роговицы среди населения развивающихся стран. Для восстановления поврежденной поверхности роговицы в последние годы предложены различные технологии. Одним из актуальных направлений в вопросе заживления дефекта и ускорения регенерации роговицы является применение биodeградируемых материалов на основе шелка, в том числе рекомбинантных аналогов белков каркасной нити паучьего шелка – спидроинов. Эти белки известны своим оптимальным балансом прочности и эластичности, что при имеющейся биологической совместимости, неиммуногенности и способности к биodeградации позволяет использовать их в качестве биоматериала для тканевой инженерии и регенеративной медицины. В связи с этим в данной работе проведена детальная оценка цитотоксичности гидрогелей на основе рекомбинантного спидроина rS2/12-RGDS в отношении эпителиальных клеток и кератоцитов, выделенных из человеческих роговиц, с учетом возможных изменений фенотипа и миграционной активности данных клеток. Проведенное исследование демонстрирует перспективность и терапевтический потенциал гидрогелей на основе рекомбинантного спидроина.

Ключевые слова: роговица, шелк, рекомбинантный спидроин, регенерация, клетки.

DOI: 10.31857/S2686738924020098, EDN: WFGSTZ

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

² Федеральное государственное автономное учреждение “Национальный медицинский исследовательский центр “Межотраслевой научно-технический комплекс “Микрохирургия глаза” имени академика С. Н. Федорова” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

*E-mail: igor_agapov@gmail.com

Роговица является одной из оптических сред глаза с уникальным гистологическим строением, однако в результате травматического либо инфекционного воздействия ткань роговицы может необратимо потерять прозрачность, что вызывает значительное снижение остроты зрения и качества жизни пациента [1–3]. Биосовместимые материалы для восстановления ткани роговицы должны соответствовать характеристикам нативной ткани роговицы и обладать подходящими механическими и гидрофильными свойствами, подконтрольной скоростью биodeградации, а также биосовместимостью и прозрачностью [4]. На сегодня в качестве материалов, предназначенных для восстановления роговицы, активно исследуются гидрогели (ГГ) на основе различных природных биоматериалов [5–8]. ГГ на основе рекомбинантных спидроинов (РС), представляющих собой аналоги – белков каркасной нити паутины пауков-кругопрядов, характеризуются очень высокой способностью к адгезии и пролиферации клеток. Благодаря превосходным механическим свойствам и сходству с внеклеточ-

ным матриксом такие ГГ широко исследуются и применяются в областях тканевой инженерии, доставки лекарств и биопроизводства [9–11]. Ранее нами было показано, что материалы на основе РС rS1/9 и rS2/12 (в том числе ГГ и микрогели) эффективно поддерживают адгезию и пролиферацию гепатоцитов, кардиомиоцитов, клеток кости, фибробластов, эпителиальных и мезенхимальных клеток, вызывают васкуляризацию и иннервацию в зоне дефекта при подкожном введении животным [12–14]. Еще одним из преимуществ ГГ на основе РС является возможность введения в их структуру различных биологически активных пептидов, включая мотивы белков внеклеточного матрикса, что значительно расширяет возможности их применения для регенерации различных тканей [15]. Таким образом, биосовместимые ГГ на основе РС обладают одновременно отсутствием иммуногенности, биосовместимостью, регулируемой пористостью, прочностью, упругостью, регулируемым временем биорезорбции и способностью поддерживать эффективный рост и пролиферацию клеток, что в совокупности делает их подходящим материалом для восстановления роговицы.

В настоящей работе для получения ГГ был использован РС rS2/12-RGDS [12]. В этом белке к полноразмерному РС rS2/12 [16] через нейтральный линкер (GGS)₃GG на С-конце молекулы присоединен тетрапептид RGDS из фибронектина, который узнает интегрины большинства клеток [17], чем существенно повышается биосовместимость биоматериала. В большом количестве работ [18] и в наших исследованиях (например, [12]) было продемонстрировано выраженное положительное влияние введения этих последовательностей на взаимодействие матриксов с клетками.

Целью настоящего исследования явилось исследование влияния ГГ на основе РС rS2/12-(GGS)₃GG-RGDS на пролиферативную активность клеток эпителия и кератоцитов роговицы человека.

Ферментацию клеток дрожжевого штамма-продуцента РС *Saccharomyces cerevisiae* и выделение и очистку искомого белка с помощью ионообменной хроматографии осуществляли в соответствии с ранее опубликованным протоколом [19]. Образцы ГГ получали из 3%-ного раствора высокоочищенного РС, как описано в работе [20]. Субстанцию образцов ГГ в закрытых пробирках в герметично закрытом пакете подвергали стерилизации в радиационно-технологической установке (РТУ) с радионуклидными источниками ионизирующего излучения закрытого типа ⁶⁰Co РХМ-γ-20 с характерной энергией гамма-кванта 1,3 МэВ в течение 10 ч с подачей дозы в 1 кГр/ч. Использованный мягкий вариант γ-облучения позволил сохранить консистенцию ГГ и достичь достаточной стерильности.

Образцы ГГ были разделены на 3 группы из расчета конечной концентрации РС в ГГ: 1-я группа – 0,5%; 2-я группа – 1,0%; 3-я группа – 1,5%.

Для оценки стерильности полученных образцов ГГ из РС выполняли бактериологическое исследование на тиогликолевой среде и бульоне Сабуро по стандартному протоколу. Длительность контроля составляла 14 сут. Результаты бактериологического исследования полученных образцов ГГ на основе РС спустя 14 сут показали отсутствие роста микроорганизмов во всех исследуемых группах, что свидетельствует о стерильности изучаемых образцов.

Кератоциты были выделены из трупных донорских роговиц, полученных из глазного тканевого банка ФГАУ “НМИЦ “МНТК “Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова” Минздрава России (г. Москва). Для выделения клеточных культур были получены 3 роговицы: 1 от донора мужского пола и 2 от доноров женского пола. Средний возраст доноров составил 49 ± 10 лет. Среднее время от момента смерти до ввода в эксперимент составило 9 ± 4 ч.

Выделение клеточных культур из стромы роговицы выполнялось по стандартному протоколу и включало следующие этапы: ферментативную обработку, измельчение, повторную ферментативную обработку, центрифугирование клеточной взвеси. Культуру эпителиальных клеток получали за счет миграции клеток.

Для изучения влияния ГГ из РС на клетки роговицы полученные охарактеризованные клеточные культуры кератоцитов и эпителиальных клеток переносили в ЧП диаметром 35 мм² в концентрации 1×10⁶ для кератоцитов и 2×10⁶ для эпителиальных клеток. Культивирование проводили при стандартных условиях, в трех повторах. При достижении 70% конfluenceности клеток удаляли культуральную среду с внесением 0.5 мл ГГ и 0.5 мл культуральной среды согласно 4 группам исследования: 1-я группа – 0,5% ГГ; 2-я группа – 1,0%; 3-я группа – 1,5%; 4 группа – контроль (интактные клеточные культуры). Оценку роста и морфологии клеток осуществляли при помощи инвертированного светового фазово-контрастного микроскопа IX-81 (Olympus, Япония).

Проведенное иммуногистохимическое исследование (ИГХ) до эксперимента верифицировало исходный фенотип эпителиальных клеток и кератоцитов. Так, по данным ИГХ выделенные эпителиальные клетки экспрессировали маркеры, характерные для клеток данного типа: ABCG2, integrinb1, connexin 43. Выделенные кератоциты стромы роговицы человека экспрессировали характерные маркеры кератоцитов – кератокан, кератансульфат и

Таблица 1. Результаты МТТ-теста для эпителиальных клеток и кератоцитов

	Эпителиальные клетки			Кератоциты		
	Среднее значение (тыс. клеток)	Стандартное отклонение	Количество	Среднее значение (тыс. клеток)	Стандартное отклонение	Количество
Группа 1	138,00	1,42	5	127,20	4,60	5
Группа 2	138,94	1,94	5	129,20	4,13	5
Группа 3*	142,98	1,18	5	140,15	2,66	5
Группа 4 (контроль)	137,00	1,58	5	125,00	1,18	5

Примечание. * – статистически значимые отличия ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

люмикан – при отсутствии либо слабой экспрессии α -гладкомышечного актина.

После совместного культивирования образцов ГГ из групп 1–3 с эпителиальными клетками и кератоцитами выполняли повторное ИГХ-исследование для верификации итогового фенотипа клеточных культур. По окончании эксперимента по данным ИГХ было верифицировано отсутствие изменений в экспрессии характерных маркеров эпителиальных клеток и кератоцитов во всех группах.

Таким образом, установлено, что ГГ из РС rS2/12-RGDS в испытанных концентрациях не оказывают отрицательного влияния на экспрессию характерных маркеров эпителиальных клеток и кератоцитов.

Для изучения жизнеспособности клеток при культивировании с полученными образцами ГГ был выполнен МТТ-тест по стандартному протоколу. Обнаружено статистически значимое увеличение количества как эпителиальных клеток, так и кератоцитов в группе 3 по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (группа 4). Таким образом, ГГ с концентрацией 1,5% статистически значимо стимулировали пролиферативную активность как эпителиальных клеток, так и кератоцитов.

В то же время не было выявлено статистически значимого влияния образцов ГГ из РС в концентрациях 0,5–1,0% на жизнеспособность обоих типов клеток по сравнению с контролем. Полученные значения МТТ-теста для эпителиальных клеток и кератоцитов представлены в табл. 1.

Также было проведено изучение миграционной активности клеток в ходе скарификационного теста (определение ранозаживляющей активности ГГ), который выполнялся по стандартному протоколу с формированием однотипного линейного дефекта при помощи хирургического ножа-скарификатора. Скарификационный тест проводили по следующему алгоритму: в лунки культурального планшета вносили суспензию клеток с добавлением полной культуральной среды, по достижении

клеточного монослоя формировали однотипный дефект данного монослоя с последующей сменной полной культуральной среды. Далее в каждую лунку вносили ГГ в соответствии с группами. Так как плотность ГГ выше, чем плотность культуральной среды, ГГ покрывал клеточную культуру с зоной дефекта, а над ГГ оставалась питательная среда. Наблюдение и оценку восстановления области повреждения проводили в течение 36 ч. По результатам исследования установлено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение миграционной активности эпителиальных клеток в 1,5%-ном ГГ и кератоцитов – в 1,0 и 1,5%-ных образцах ГГ. В остальных группах отсутствие статистически значимых отличий в миграционной активности клеток обнаружено не было. Полученные значения скарификационного теста для эпителиальных клеток и кератоцитов представлены на рис. 1 и в табл. 2.

Выполненное исследование продемонстрировало зависимость эффективности взаимодействия клеток роговицы глаза с ГГ от концентрации в нем РС и позволило подобрать оптимальную концентрацию (1,5%), вызывающую выраженное положительное влияние на пролиферативную и миграционную активность эпителиальных клеток и кератоцитов, что, видимо, связано с более высокой концентрацией сайтов связывания (и в том числе последовательностей RGDS) клеток. При этом ГГ сохранял полную прозрачность.

Показанная в данном исследовании способность ГГ на основе РС rS2/12-RGDS стимулировать пролиферативную и миграционную активность клеток является одним из важнейших критериев терапевтической значимости этих материалов.

Таким образом, полученные в данной работе ГГ на основе РС rS2/12-RGDS могут рассматриваться как перспективный экспериментальный материал с терапевтическим потенциалом, который способен стимулировать процессы клеточной миграции и пролиферации, не вызывая при этом изменений клеточного фенотипа.

Таблица 2. Результаты скарификационного теста для эпителиальных клеток и кератоцитов

	Кератоциты			Эпителиальные клетки		
	Среднее значение (ч)	Среднее отклонение	Количество	Среднее значение (ч)	Среднее отклонение	Количество
Группа 1	29	1,97	5	31	1,58	5
Группа 2	27*	2,37*	5	30	1,58	5
Группа 3	26**	1,94**	5	28**	1,27**	5
Группа 4 (контроль)	30	2,37	5	32	1,96	5

Примечание. *, ** – статистически значимые отличия ($p < 0,05$) по сравнению с контролем).

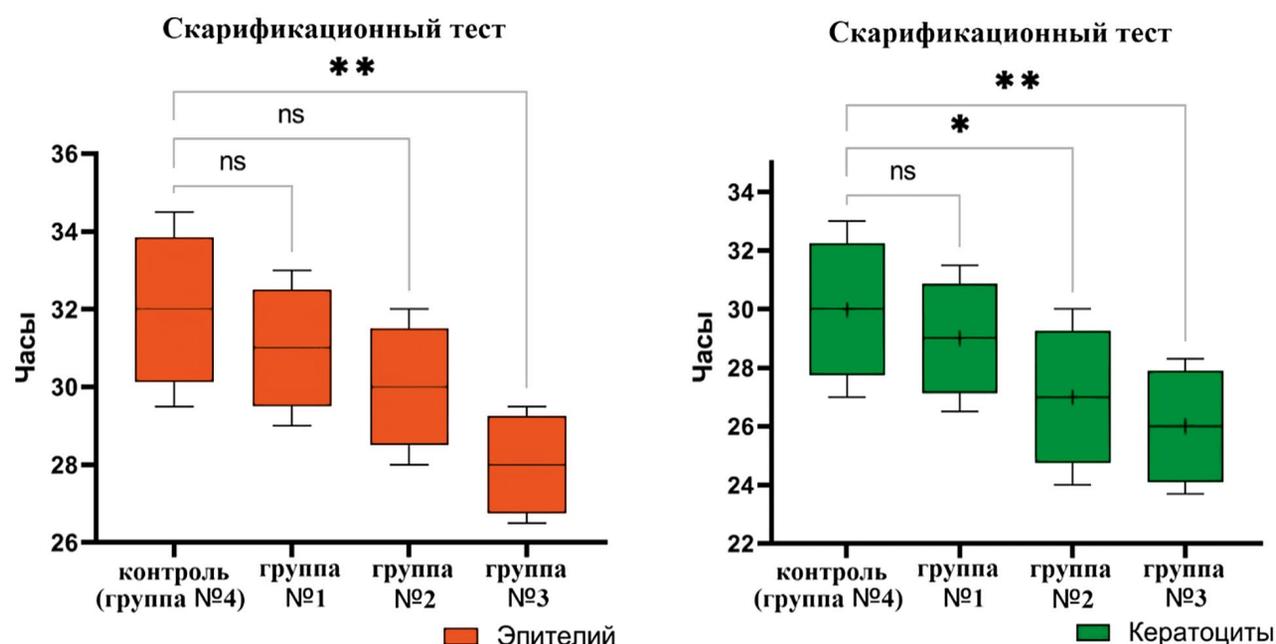


Рис. 1. Результаты скарификационного теста эпителиальных клеток и кератоцитов (*; ** – статистически значимые отличия по сравнению с контролем – группой 4, $p < 0,05$; ns – отличия между опытными группами и контролем статистически не значимы, $p > 0,05$).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Культивирование штамма-продуцента, выделение и очистка РС, приготовление и стерилизация гидрогелей выполнены в рамках Государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Донорский материал (кадаверные роговицы и выделенные клетки стромы

роговицы доноров-трупов) использовали в качестве источника биоматериала для экспериментальных исследований. Исследования осуществляли в условиях *in vitro* в соответствии с официально принятыми процедурами и специальным разрешением в рамках законодательства РФ, на основании лицензии Территориального органа Росздравнадзора по Новосибирской области № Л041-00110-47/00574034 от 07.04.2020, которая позволяет использовать ткани, выделенные из кадаверных человеческих глаз для целей трансплантации и научных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Whitcher J.P., Srinivasan M., Upadhyay M.P.* Corneal blindness: a global perspective // *Bull World Health Organ.* 2001. V. 79(3). P. 214–221.

2. *Gain P., Jullienne R., He Z., et al.* Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking // *JAMA Ophthalmol.* 2016. V. 134 (2). P. 167–173.
3. *Jeng B. H., Ahmad S.* In Pursuit of the Elimination of Corneal Blindness: Is Establishing Eye Banks and Training Surgeons Enough? // *Ophthalmology.* 2021. V. 128(6). P. 813–815.
4. *Mahdavi S.S., Abdekhodaie M.J., Mashayekhan S., et al.* Bioengineering Approaches for Corneal Regenerative Medicine // *Tissue Eng Regen Med.* 2020. V. 17 (5). P. 567–593.
5. *El-Sherbiny I.M., Yacoub M.H.* Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges // *Glob Cardiol Sci Pract.* 2013. V. 2013 (3). P. 316–342.
6. *Jameson J.F., Pacheco M.O., Nguyen H.H., et al.* Recent Advances in Natural Materials for Corneal Tissue Engineering // *Bioengineering (Basel).* 2021. V. 8(11) P. 161.
7. *Han Y., Li C., Cai Q., et al.* Studies on bacterial cellulose/poly(vinyl alcohol) hydrogel composites as tissue-engineered corneal stroma // *Biomed Mater.* 2020. V. 15(3). P. 035022.
8. *Kong B., Chen Y., Liu R., et al.* Fiber reinforced GelMA hydrogel to induce the regeneration of corneal stroma // *Nat Commun.* 2020. V. 11 (1). P. 1435.
9. *Bowen C.H., Dai B., Sargent C.J., et al.* Recombinant Spidroins Fully Replicate Primary Mechanical Properties of Natural Spider Silk // *Biomacromolecules.* 2018. V. 19 (9). P. 3853–3860.
10. *Zhang Q., Li M., Hu W., et al.* Spidroin-Based Biomaterials in Tissue Engineering: General Approaches and Potential Stem Cell Therapies // *Stem Cells Int.* 2021. V. 2021. P. 7141550.
11. *Ramezaniaghdam M., Nahdi N.D., Reski R.* Recombinant Spider Silk: Promises and Bottlenecks // *Front Bioeng. Biotechnol.* 2022. V. 10. P. 835637.
12. *Teplenin A., Krasheninnikova A., Agladze N., et al.* Functional analysis of the engineered cardiac tissue grown on recombinant spidroin fiber meshes // *PLoS One.* 2015. V. 10 (3). P. e0121155,
13. *Аганов И.И., Пустовалова О.Л., Мойсенович М.М. и др.* Трехмерный матрикс из рекомбинантного белка паутины для тканевой инженерии // Доклады Академии наук. 2009. Т. 426. № 1. С. 115–118.
14. *Аганова О.И., Ефимов А.Е., Мойсенович М.М. и др.* Сравнительный анализ трехмерной наноструктуры пористых биodeградируемых матриц из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка для регенеративной медицины // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2015. Т. 17 (2). С. 37–44.
15. *Jansson R., Thatikonda N., Lindberg D., et al.* Recombinant spider silk genetically functionalized with affinity domains // *Biomacromolecules.* 2014. V. 15 (5). P. 1696–1706.
16. *Bogush V.G., Sokolova O.S., Davydova L.I., et al.* A novel model system for design of biomaterials, based on recombinant analogs of spider silk protein // *J Neuroimmune Pharmacol.* 2009. V. 4 (1). P. 17–27.
17. *Hirano Y., Okuno M., Hayashi T., et al.* Cell-attachment activities of surface immobilized oligopeptides RGD, RGDS, RGDV, RGDT, and YIGSR toward five cell lines // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1993. V. 4. P. 235–243.
18. *Kumar V.B., Tiwari O.S., Finkelstein-Zuta G., et al.* Design of Functional RGD Peptide-Based Biomaterials for Tissue Engineering // *Pharmaceutics.* 2023. V. 15. P. 345.
19. *Revkova V., Sidoruk K., Kalsin V., et al.* Spidroin silk fibers with bioactive motifs of extracellular proteins for neural tissue engineering // *ACS Omega.* 2021. V. 6. P. 15264–15273.
20. *Nosenko M.A., Moysenovich A.M., Zvartsev R.V., et al.* Novel Biodegradable Polymeric Microparticles Facilitate Scarless Wound Healing by Promoting Re-epithelialization and Inhibiting Fibrosis // *Frontiers in Immunology.* 2018. V. 9. P. 2851.

HYDROGELS BASED ON RECOMBINANT SPIDROIN STIMULATE PROLIFERATION AND MIGRATION OF HUMAN CORNEA CELLS

**O. I. Agapova^a, D. S. Ostrovsky^b, M. Kh. Khubetsova^b, T. Z. Kerimov^{b,c}, S. A. Borzenok^{b,c},
V. G. Bogush^d, L. I. Davydova^d, S. E. Cheperegin^d, A. E. Efimov^a, I. I. Agapov^{a,#},
Academician of the RAS V. G. Debabov^d**

^a*Federal State Budgetary Institution “Academician V.I.Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs”, of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation Moscow, Russian Federation.*

^b*S. Fyodorov Eye Microsurgery Complex Federal State Institution of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation*

^c*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation*

^d*The National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, Russian Federation*

[#]*E-mail: igor_agapov@gmail.com*

This article presents the results of studying the impact of recombinant spidroin hydrogel on posterior epithelial cells and human corneal keratocytes in an in vitro experiment. The World Health Organization in its studies has established a high prevalence of corneal injuries among the population of developing countries. In recent years, various technologies have been proposed to restore the damaged surface of the cornea. The use of biodegradable silk-based materials, such as spidroins is one of the main parts of scientific research of corneal regeneration. Spidroins are well known for their optimal balance of strength and elasticity, which, given their biological compatibility, non-immunogenicity and biodegradability, allows them to be used as a biomaterial for tissue engineering and regenerative medicine. In this reason a detailed assessment of the cytotoxicity of hydrogels based on recombinant rS2/12-RGDS spidroin on the epithelial cells and keratocytes was performed here, taking into attention possible changes of the phenotype and migratory activity of these cells. This study demonstrates the promise and therapeutic potential of hydrogels based on recombinant spidroin.

Keywords: cornea, silk, spidroin, regeneration, cells.

УДК 57.01

СЕНСОРНЫЕ СТРУКТУРЫ КАРАПАКСА САМЦОВ TANTULOCARIDA (CRUSTACEA) НЕ ГОМОЛОГИЧНЫ РЕШЕТЧАТЫМ ОРГАНАМ THECOSTRACA

© 2024 г. А. С. Савченко^{1,*}, Г. А. Колбасов²

Поступило 10.11.2023 г.

После доработки 20.11.2023 г.

Принято к публикации 25.11.2023 г.

Впервые проведены ультраструктурные исследования сенсорного аппарата самцов *Tantulocarida* (Crustacea). Сравнение полученных ультраструктурных данных с данными о строении чувствительных органов карапакса ракообразных класса *Thecostraca* позволило сделать выводы о возможных гомологиях и уточнить филогенетическое положение *Tantulocarida*.

Ключевые слова: сенсорные структуры, решетчатые органы, филогенетическое положение, *Tantulocarida*, *Thecostraca*

DOI: 10.31857/S2686738924020108, EDN: WFGCWL

Tantulocarida — небольшая группа микроскопических паразитических ракообразных, которые используют в качестве хозяев других рачков. Тантулокариды распространены повсеместно, однако до сих пор остаются наименее изученной группой Crustacea. Миниатюризация и паразитический образ жизни привели к существенным морфологическим трансформациям почти всех стадий жизненного цикла тантулокарид. Так, для них характерно практически полное отсутствие головных конечностей. В результате сравнительно-морфологическое определение филогенетического положения *Tantulocarida* затруднено. Единственная попытка использования молекулярно-филогенетических методов показала близкородственные связи *Tantulocarida* и обширного класса *Thecostraca* (*Cirripedia* + *Ascothoracida* + *Facetotecta*), а именно, сестринское положение тантулокарид и усногих ракообразных (*Cirripedia*) [1]. Однако для подтверждения такого родства требуется сравнительно-морфологический анализ, который позволит выявить возможные апоморфии. Монофилия таксона *Thecostraca* подтверждена как по молекулярным, так и по морфологическим критериям. Одной из апоморфий этой группы является наличие на карапаксе личинок специфических сенсорных структур, так называемых решетчатых органов.

Практически постоянным является не только само наличие решетчатых органов у представителей всех таксонов текострак, но и их число (6–5 пар), а также схожее строение и происхождение этих чувствительных органов. Было показано, что решетчатые органы являются дериватами сенсорных щетинок, которые присутствуют на головном щите еще на науплиальной стадии [2]. Если *Tantulocarida* действительно входят в состав *Thecostraca*, встает вопрос о наличии у них решетчатых органов или гомологичных им сенсорных структур. Если такие будут обнаружены, то это позволит убедиться в достоверности полученного по молекулярным данным результата о сестринском положении *Tantulocarida* + *Cirripedia*. Личиночная стадия тантулокарид — тантулюс не имеет характерных решетчатых органов, что подтверждено исследованиями сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии [3]. В то же время у самцов тантулокарид на карапаксе имеются характерные сенсорные структуры в виде пор — ямок с щетинками. Возможно, именно эти структуры являются гомологами решетчатых органов *Thecostraca*?

Целью данной работы было выявление возможных гомологий сенсорных структур, имеющих на карапаксе самцов *Tantulocarida*, и решетчатых органов представителей *Thecostraca*.

Материал был собран в окрестностях ББС МГУ при помощи гипербентосного траления на мягких грунтах на глубинах 30–50 м в районе Крестовых островов. Грунт был промыт пузырьковым методом, что позволяет собрать различных животных,

¹МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

²ББС МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: as.savchenko1@gmail.com

прилипающих к поверхностной пленке воды. Пробы были просмотрены при помощи стереомикроскопа для отбора гарпактицид, зараженных тантулокаридами. Непродолжительное содержание копепоид *Bradya typica* Voeseck, 187, зараженных *Arcticotantulus pertzovi* Kornev, Thesunov, Rybnikov 2008, позволило вывести в лабораторных условиях, самцов этого вида тантулокаррид. Материал был зафиксирован 2,5% глутаровым альдегидом на PBS, постфиксирован OsO₄, дегидратирован и заключен в смолу для исследования на трансмиссионном электронном микроскопе JEOL 1011 в МЛЭМ МГУ. Для сканирующей электронной микроскопии дегидратированный материал был высушен в критической точке и напылен смесью платины и палладия. Образцы исследовали на JEOL JSM-6380 в МЛЭМ МГУ.

Строение и образ жизни самцов тантулокаррид/ Самцы тантулокаррид являются свободноживущей непитающейся стадией жизненного цикла. Из 39 видов *Tantulocarida* самцы известны только для 9. Для описания самцов в основном применялась световая микроскопия [4–6], но для нескольких видов приводятся данные, полученные при помощи СЭМ [7–9]. Для всех самцов характерно наличие цефалоторакса, включающего два грудных сегмента, шесть пар плавательных грудных ног, непарный пенис на седьмом сегменте тела (рис. 1, *a*). Какие-либо другие конечности на теле самца отсутствуют, на голове есть только рудименты антеннул, представленные пучками эстетасков. Однако, судя по отсутствию нормальных плавательных конечностей у самок тантулокаррид [10], функция поиска полового партнера ложится именно на самцов.

Сенсорный аппарат самцов представлен не только парными кластерами эстетасков на передней части головы (см. рис. 1, *a, б*), но и специальными порами (ямками) с сенсиллами, которые располагаются на карапаксе [9]. Для всех описанных самцов характерно наличие семи пар таких сенсорных ямок, которые сгруппированы в два кластера – пять передних (A1–A5) и две задние пары (P1–P2) (рис. 1, *a, б*). Мы впервые провели ультраструктурные исследования сенсорного аппарата тантулокаррид на примере вида *A. pertzovi*.

Нами показано, что чувствительные ямки имеют два типа строения. Первые (например, A5) представляют собой небольшое углубление в кутикуле с широким входом, ведущее в короткий круглый в сечении слепо замкнутый канал, залегающий параллельно поверхности кутикулы и имеющий толстые кутикулярные стенки (см. рис. 1, *z–e*). От верхней стенки канала, имеющей тонкую кутикулу, отходит одна щетинка диаметром около 1 мкм, которая почти сразу расщепляется на не-

сколько (2–7) сенсилл. В основание щетинки заходит отросток дендрита. Сенсиллы 0,5 мкм в диаметре имеют полость, в которой также располагается тонкий нервный отросток (см. рис. 1, *z–e*). Другой тип пор (например, A4) характеризуется отсутствием описанного выше канала, такие поры представлены небольшим впячиванием покровов. От дна такой ямки, имеющего тонкую эпикуткулярную выстилку, отходит одна щетинка, имеющая расширенное основание и более тонкую ножку (см. рис. 1, *в*). Через ножку внутрь щетинки заходит нервный отросток.

Полученные данные позволяют провести сравнение сенсорных структур самцов тантулокаррид и представителей текострак.

1. Число сенсорных органов карапакса. Все ракообразные класса Thecostraca на личиночной, а иногда и на взрослой стадии изначально имеют на поверхности карапакса шесть (Facetotecta) или пять (Ascothoracida, Cirripedia) пар решетчатых органов [11].

Недавно нами было показано, что у фасетотект все же имеется шесть пар решетчатых органов, а не пять, как считалось ранее [11]. Может ли это число коррелировать с числом сегментов тела, входящих в состав переднего отдела (цефалона или цефалоторакса)?

Циприсовидные личинки Cirripedia имеют максимум пять решетчатых органов, что соответствует пяти головным сегментам тела, которые покрыты одностворчатым карапаксом, сложенным вдоль дорсомедиальной линии. Столько же пар решетчатых органов на двустворчатом карапаксе Ascothoracida.

Тагмозис Facetotecta немного отличается – у них также имеется одностворчатый карапакс, который покрывает пять головных сегментов только с дорсальной стороны, а не с боков. В то же время шести парам грудных конечностей, каждая из которых расположена на отдельном вентральном стерните, соответствует всего пять тергитов на дорсальной стороне. Логично было бы предположить слияние первого сегмента груди (тергита) с головными и формирование цефалоторакса. Однако характер прикрепления мускулатуры конечностей указывает на слияние первого и второго грудных сегментов между собой [12]. Таким образом, у фасетотект, как и у других текострак, отсутствует цефалоторакс, а сенсорные структуры карапакса не отражают число сегментов в переднем отделе тела. Тем не менее у фасетотект 6, а не 5, пар решетчатых органов.

У тантулокаррид имеется цефалоторакс, который включает два грудных сегмента, что вместе с головными дает общее число семь. Что характер-

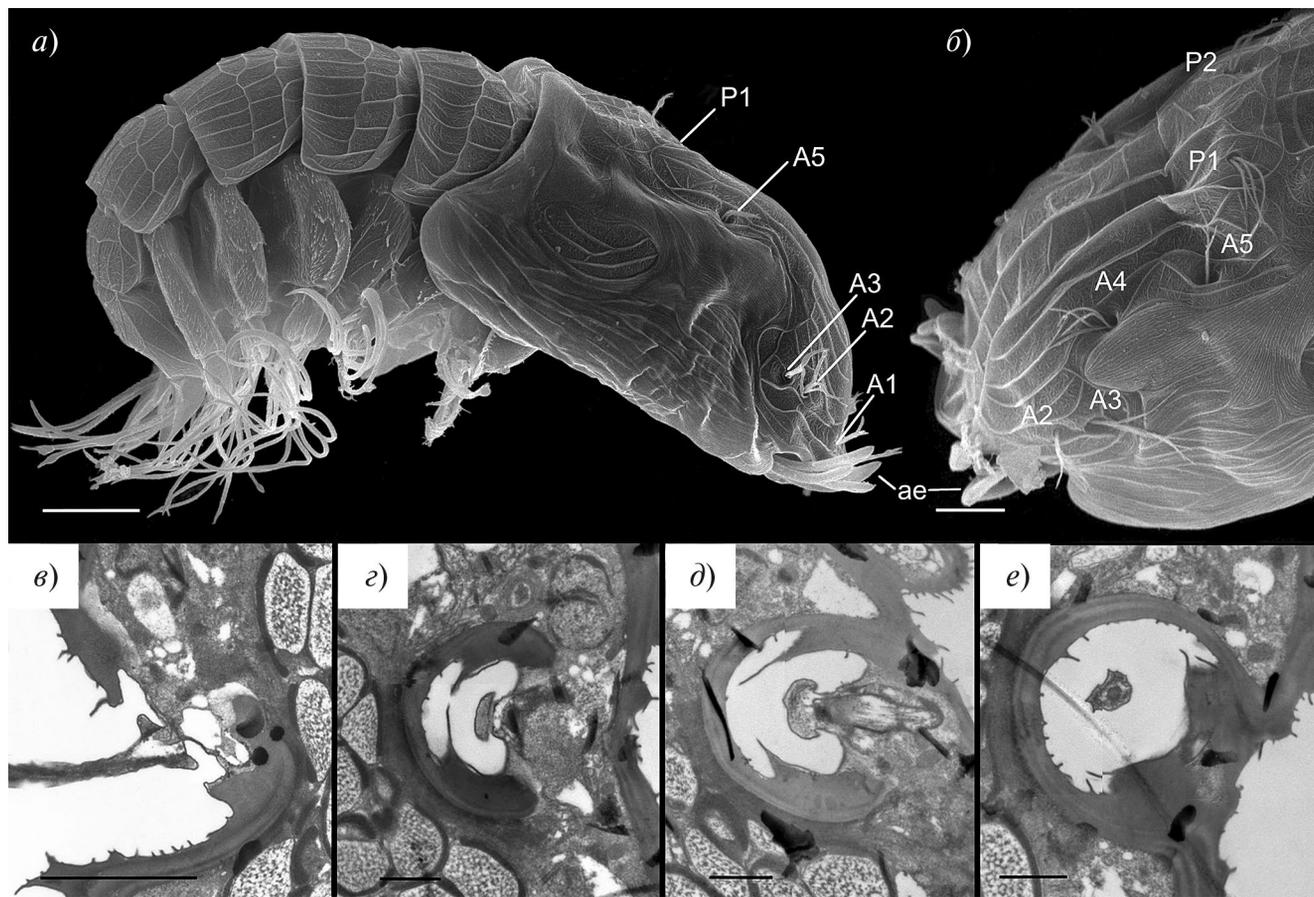


Рис. 1. Сенсорные структуры карапакса самцов *A. pertzovi*: *a* – габитус самца, вид сбоку (сканирующая электронная микроскопия, СЭМ); *б* – передняя часть карапакса (СЭМ); *в* – продольный срез через щетинку поры А4 (трансмиссионная электронная микроскопия, ТЭМ); *г* – *е* – последовательные поперечные срезы карапакса через пору А5 (ТЭМ). Обозначения: А1–А5, Р1–Р2 поры с щетинками переднего и заднего кластеров, ае – эстетаски. Масштабные линейки: *a* – 20 мкм; *б* – 10 мкм; *в* – 2 мкм; *г*–*е* – 1 мкм.

но, именно семь пар сенсорных ямок с сенсиллами присутствует у самцов тантулокарид.

Таким образом, невозможно сделать однозначный вывод по поводу связи числа парных сенсорных структур и числа сегментов, формирующих передний отдел тела у Thecostraca и Tantulocarida.

Важно отметить, что решетчатые органы отсутствуют и у личинок тантулокарид – тантулюсов [3], стадии, вероятно, аналогичной ципривидной личинке усоногих и других текостраков.

2. Ультраструктура и происхождение. Решетчатые органы были обнаружены и исследованы у всех крупных таксонов Thecostraca [13–15]. Их наличие характерно для постнауплиальной стадии жизненного цикла – ципривидной личинки усоногих, Y- циприса фасетотект и аскоторацидной личинки мешкогрудых раков (Ascothoracida). Ультраструктурные исследования с применением ТЭМ позволили описать единый план строения – наличие кутикулярной полости, распо-

гающейся параллельно поверхности карапакса, куда заходят отростки дендритов. У решетчатых органов также изначально имеется терминальная пора, которая может располагаться в передней или в задней части. У некоторых таксонов (Cirripedia) поверхность над субкутикулярной полостью несет многочисленные мельчайшие перфорации (поровое поле). У базальной группы (Ascothoracida) над камерой имеется киль, залегающий в продольном углублении кутикулы. Важно отметить, что все решетчатые органы у особой одного вида текостраков имеют одинаковое строение.

Рыбаковым с соавторами было показано, что решетчатые органы у всех текостраков имеют схожее происхождение и являются дериватами специализированных сенсилл головного щита науплиальной стадии [2]. Эволюция этих сенсорных органов связана с перемещением терминальной поры на передний конец, а также с формированием порового поля.

Ракообразные класса Thecostraca на взрослой стадии ведут либо прикрепленный (Cirripedia), либо паразитический (Ascothoracida, Facetotecta) образ жизни. Ципривидная личинка усонюгих и аналагичные ципрису личинки аскоторацид и фасетотект являются расселительной стадией и участвуют в поиске подходящего для оседания субстрата или специфического хозяина. По-видимому, именно с этим связано возникновение у этих ракообразных таких оригинальных органов чувств, как решетчатые органы [15].

Подводя итоги проведенного сравнения, мы можем отметить схожие черты сенсорных структур тантулокарид и текострак: парный характер, постоянное число, локализация на дорсальной поверхности карапакса, а также некоторые ультраструктурные особенности – наличие в основе одной щетинки, которая выходит из углубления в покровах.

Однако общий план строения решетчатых органов сильно отличается от такового у сенсорных ямок самцов тантулокарид, у последних отсутствуют типичные структуры – терминальная пора и поровое поле. Существенные различия в строении сенсорных ямок у самцов одного вида также не позволяют сделать вывод о гомологии этого сенсорного аппарата с решетчатыми органами Thecostaca.

Таким образом, наши данные, скорее, не подтверждают гомологию между сенсорными ямками карапакса самцов Tantulocarida и решетчатыми органами Thecostraca. Молекулярные данные о включении тантулокарид в состав текострак и отсутствие у них решетчатых органов вступают в противоречие с тезисом о монофилии Thecostraca по этому признаку. Мы не можем исключать, что структуры, гомологичные решетчатым органам, будут обнаружены у половой самки тантулокарид – стадии, которая остается совершенно не изученной. Однако до тех пор мы можем констатировать, что результаты молекулярного анализа о сестринском положении Tantulocarida и Cirripedia не подтверждаются морфологически и должны быть пересмотрены.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам ББС МГУ за содействие в получении материала, микроскопические исследования проводились на оборудовании Межкафедральной лаборатории электронной микроскопии МГУ.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не имеют конфликта интересов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ.

Исследование поддержано грантом РНФ 22-24-00182

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

В соответствии с пунктом 3 главы 1 Директивы 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях, требования биоэтики не распространяются на объект данного исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Petrunina A.S., Neretina T.V., Mugue N.S., Kolbasov G.A.* Tantulocarida vs Thecostraca: inside or outside. First attempts to resolve phylogenetic position of this parasitic taxon using gene sequences // *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 2014. V. 52. P. 100–108.
2. *Rybakov A.V., Høeg J.T., Jensen P.G., Kolbasov G.A.* The Chemoreceptive Lattice Organs in Cypris Larvae Develop from Naupliar Setae (Thecostraca: Cirripedia, Ascothoracida and Facetotecta) // *Zoologischer Anzeiger*. 2003. V. 242. P. 1–20.
3. *Petrunina A.S., Høeg J.T., Kolbasov G.A.* Anatomy of the Tantulocarida: first results obtained using TEM and CLSM. Part 1: tantulus larva // *Organisms Diversity and Evolution*. 2018. V. 18. № 4. P. 459–477.
4. *Boxshall G.A., Huys R.* New tantulocarid, *Stygotantulus stocki*, parasitic on harpacticoid copepods, with an analysis of the phylogenetic relationships within the Maxillopoda // *Journal of Crustacean Biology*. 1989. V. 9. № 1. P. 126–140.
5. *Huys R.* *Coralliotantulus coomansi* gen. et sp.n.: First record of a tantulocaridan (Crustacea: Maxillopoda) from shallow subtidal sands in tropical waters // *Stylogogia*. 1990. V. 5. № 3. P. 183–198.
6. *Ohtsuka S., Boxshall G.A.* Two new genera of Tantulocarida (Crustacea) infesting asellote isopods and siphonostomatoid copepods from western Japan // *Journal of Natural History*. 1998. V. 32. P. 683–699.
7. *Boxshall G.A., Lincoln R.J.* The life cycle of the Tantulocarida (Crustacea) // *Philosophical Transaction of the Royal Society of London. B. Biological Sciences*. 1987. V. 315. P. 267–303.
8. *Boxshall G.A., Huys R., Lincoln R.J.* A new species of the Microdajus (Crustacea: Tantulocarida) parasitic on a tanaid in the northeastern Atlantic, with observations on *M. langi* Greve // *Systematic Parasitology*. 1989. V. 14. P. 17–30.
9. *Petrunina A.S., Kolbasov G.A.* Morphology and ultrastructure of definitive males of *Arcticotantulus pertzovi* and *Microdajus tchesunovi* (Crustacea: Tantulocarida) // *Zoologischer Anzeiger*. 2012. V. 251. P. 223–236.
10. *Huys R., Boxshall G.A., Lincoln R.J.* The tantulocaridan life cycle: the circle closed? // *Journal of Crustacean Biology*. 1993. V. 13. P. 432–442.

11. Kolbasov G.A., Savchenko A.S., Dreyer N., Chan B.K.K., Høeg, J.T. A synthesis of the external morphology of cypriidiform larvae of Facetotecta (Crustacea: Thecostraca) and the limits of the genus *Hansenocaris* // Ecology and Evolution. 2022. V. 12. № 11. P. 1–21.
12. Grygier M.J. New records, external and internal anatomy, and systematic position of Hansen's Y-larvae (Crustacea: Maxillopoda: Facetotecta) // Sarsia. 1987. V. 72. P. 261–278.
13. Elfimov A.S. Morphology of the carapace of cypris larva of the barnacle *Heteralepas mystacophora* // Sov. J. Mar. Biol. 1986. V. 12. P. 152–156.
14. Jensen P.G., Moyses J., Høeg J.T. & Al-Yahya, H. Comparative SEM studies of lattice organs: putative sensory structures on the carapace of larvae from Ascothoracida and Cirripedia (Crustacea Maxillopoda Thecostraca) // Acta Zoologica. 1994. V. 75. P. 125–142.
15. Høeg J.T. Kolbasov G.A. Lattice organs in y-cyprids of Facetotecta and their significance in the phylogeny of the Crustacea Thecostraca // Acta Zoologica (Stockholm). 2002. V. 83. P. 67–69.

THE SENSORY STRUCTURES OF THE CARAPACE OF MALE TANTULOCARIDA ARE NOT HOMOLOGOUS TO THE LATTICE ORGANS OF THECOSTRACA

A. S. Savchenko^{a, #}, G. A. Kolbasov^b

^a *Invertebrate zoology department, Biological faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

^b *White Sea Biological Station, Biological faculty Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

[#] *E-mail: as.savchenko1@gmail.com*

For the first time, ultrastructural studies have been conducted on the sensory apparatus of male Tantulocarida (Crustacea). Comparative morphological analysis with specialized sensory structures of Thecostraca, known as lattice organs, has allowed for conclusions about possible homologies and further clarification of the phylogenetic position of Tantulocarida

Keywords: sensory structures, lattice organs, phylogenetic position, Tantulocarida, Thecostraca.

УДК 593.99, 595.123.1

NEMERTODERMATIDA – ЭНДОСИМБИОНТЫ КИШЕЧНИКА ГЛУБОКОВОДНЫХ КИШЕЧНОДЫШАЩИХ (NEMICHORDATA, TORQUARATORIDAE)

© 2024 г. О. В. Ежова^{1,*}, А. И. Лукиных¹, академик РАН В. В. Малахов¹

Поступило 15.11.2023 г.

После доработки 25.11.2023 г.

Принято к публикации 25.11.2023 г.

В печеночном отделе пищеварительного тракта глубоководного кишечнодышащего, представителя семейства *Torquaratoridae* *Quatuoralisia malakhovi* [Ezhova et Lukinykh, 2022] из Берингова моря, обнаружены червеобразные эндосимбионты. Гистологическое изучение симбионтов позволяет отнести их к группе Nemertodermatida. Представители *Torquaratoridae* по типу питания сходны с голотуриями, у которых также обнаружены эндосимбионты из таксона Xenacoelomorpha.

Ключевые слова: Xenacoelomorpha, *Quatuoralisia malakhovi*, Enteropneusta, гистологическое строение, Берингово море.

DOI: 10.31857/S2686738924020119, EDN: WFFSDJ

Глубоководные кишечнодышащие Torquaratoridae – недавно открытая группа морских беспозвоночных [1–5]. Они обитают на глубинах от 350 м до 8800 м [3, 4, 6] и, в отличие от мелководных кишечнодышащих, не зарываются в толщу грунта. В некоторых районах Мирового океана Torquaratoridae достигают высокой плотности. Так, например, в Беринговом море на глубинах около 2000 м плотность этих кишечнодышащих достигает 12 экз./м² [7]. Не подлежит сомнению, что при такой плотности Torquaratoridae играют важную роль в функционировании сообществ батиали и абиссали.

Биология Torquaratoridae изучена слабо. В частности, мало известно об их симбионтах. В первой публикации о Torquaratoridae было вскользь упомянуто, что в кишечнике *Torquarator bullocki* [Holland, Clague, Gordon, Gebruk, Pawson & Vecchione, 2005] обитают бескишечные турбеллярии и паразитические копеподы, хотя ни описания, ни иллюстраций приведено не было [1]. На подводной фотографии *Allaparus isidis* [Priede, Osborn, Gebruk, Jones, Shale, Rogacheva & Holland, 2012] был замечен белый отросток на внешней стороне генитальных крыльев торквараториды, который, возможно, является прикрепившейся пиявкой [4]. У *Quatuoralisia malakhovi* [Ezhova et Lukinykh, 2022] во всех отделах целома были найдены метацеркарии трематод [8].

Настоящая работа посвящена описанию находки симбионтов – представителей типа Nemertodermatida у глубоководных кишечнодышащих Torquaratoridae.

Материал для работы был собран 18.06.2018 г. в ходе 18-го рейса НИС “Академик М. А. Лаврентьев” в Командорской котловине Берингова моря (массив Вулканологов) при тралении на станции LV 82–9 с координатами 55.3451–55.3466° N, 167.2750–167.2752° E в диапазоне глубин 1957–1933 м. Экземпляры *Q. malakhovi* были зафиксированы для гистологического исследования в 8%-ном растворе формалина, приготовленном на морской воде. Отмывка от фиксатора и дегидратация материала проводились по стандартной методике в спиртах восходящей концентрации. Подготовленные для гистологического исследования фрагменты были залиты в парапластовые блоки и разложены с помощью микротомы Leica RM 2125 на серии поперечных и сагиттальных гистологических срезов толщиной 10 мкм. Срезы окрашивались гематоксилином Караччи и спиртовым раствором эозина. Фотографирование срезов осуществлено с применением микроскопа Микмед-6 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия, 2018) с цифровой камерой “МС-12”. Всего было изучено 5 экземпляров, в 2 из них обнаружены симбионты.

Все зараженные особи *Q. malakhovi* были самками, в каждой из них найдено по одному симбионту. Симбионты были обнаружены в просвете кишечника в переднем участке печеночного отдела

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

*E-mail: olga_ejova@mail.ru

Q. malakhovi. На срезах симбионты имеют удлинено-листовидную форму (рис. 1а, б). Размеры одной особи симбионта составляют приблизительно 900 мкм в длину и 400 мкм в самом широком участке тела, размеры другой особи – 1 мм в длину и около 870 мкм в ширину. Симбионты контактируют со складками кишечного эпителия *Q. malakhovi*.

Симбионты одеты вакуолизированным ресничным эпителием толщиной 20 мкм (рисунок, а, б, ер). Базальной пластинки, подстилающей покровный эпителий, не отмечено. Под покровным эпителием располагается субэпидермальный слой, состоящий из мелких клеток (см. рисунок, а, б, sel). Ширина субэпидермального слоя колеблется от 50 до 80 мкм. Центральная область тела занята крупными вакуолизированными клетками центральной паренхимы (см. рисунок, а, б, ср). Ротовое отверстие шириной 100 мкм находится в середине тела (см. рисунок, а, то) и ведет в цилиндрическую глотку глубиной 130 мкм (см. рисунок, а, ph). На предполагаемом переднем конце симбионта располагается статоцист (см. рисунок, в, круговая рамка). Он представляет собой овальное тело диаметром 15 мкм, подвешенное на радиальных связках. Статоциты не сохранились, однако в центре статоциста располагаются два уплощенных ядра, которые, предположительно соответствуют ядрам двух литоцитов. На переднем конце можно видеть выделение секрета фронтальных желез (см. рисунок, в, sfg). На противоположном, заднем конце субтерминально открывается отверстие полового атриума (см. рисунок, г, ga). От него вглубь тела продолжается темноокрашенный тяж, прилегающий к центральной паренхиме.

На границе субэпидермального слоя и центральной паренхимы обнаружены отдельно лежащие крупные клетки с большим ядром и темной цитоплазмой (см. рисунок б, квадратные рамки). Можно предполагать, что это гонии – предшественники половых клеток. На гистологических срезах симбионтов не обнаружено никаких структур, которые можно было бы отнести к выделительной системе. Также на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, не удалось различить нервных и мышечных волокон.

Основные черты организации обнаруженных симбионтов (отсутствие базальной пластинки покровного эпителия, положение рта и полового атриума, отсутствие выделительной системы, отсутствие оформленных гонад и расположение оогониев на границе субэпидермального слоя и центральной паренхимы, наличие статоциста с двумя литоцитами) позволяют отнести их к группе Nemertodermatida, которая вместе с Acoela и Xenoturbellida входит в таксон Xenacoelomorpha. При этом Acoela и Nemertodermatida рассматриваются как сестринские группы, образующие кладу Acoelomorpha [9–12].

В макрозообентосном сообществе на склонах массива Вулканологов на глубинах от 1370 до 4278 м доминируют главным образом различные голотурии [7]. Однако на горизонте глубин 1830–2290 м торквараторида *Q. malakhovi* вытесняет голотурий с доминирующих позиций [7, 13]. Экологические ниши Torquaratoridae и Holothuroidea перекрываются, поскольку и те, и другие являются детритофагами-собираателями [7, 14–16]. Интересно, что для мелководных голотурий также известны симбионты из таксона Acoelomorpha, обитающие в пищеварительном тракте [17, 18]. Так, в пищеварительном тракте и водных легких голотурии *Eupyrgus scaber* [Lütken, 1857] из Баренцева моря обитает *Aechmalotus pyrula* [Beklemischev, 1915], которая входит в таксон Acoela. К этому же таксону принадлежат представители рода *Aphanostoma* [Ørsted, 1845], найденные в пищеварительном тракте голотурий *Myriotrochus rinkii* Steenstrup, 1851 и *Chiridota laevis* [O. Fabricius, 1780] из Баренцева моря [18]. У голотурий *Mesothuria intestinalis* [Ascanius, 1805] и *Parastichopus tremulus* [Gunnerus, 1767] из Северного моря в пищеварительном тракте и целомических полостях обнаружена *Meara stichopi* [Westblad, 1949] из группы Nemertodermatida [17, 19]. Таким образом, сходство экологических ниш Holothuroidea и Torquaratoridae отражается в наличии близких групп эндосимбионтов.

БЛАГОДАРНОСТИ

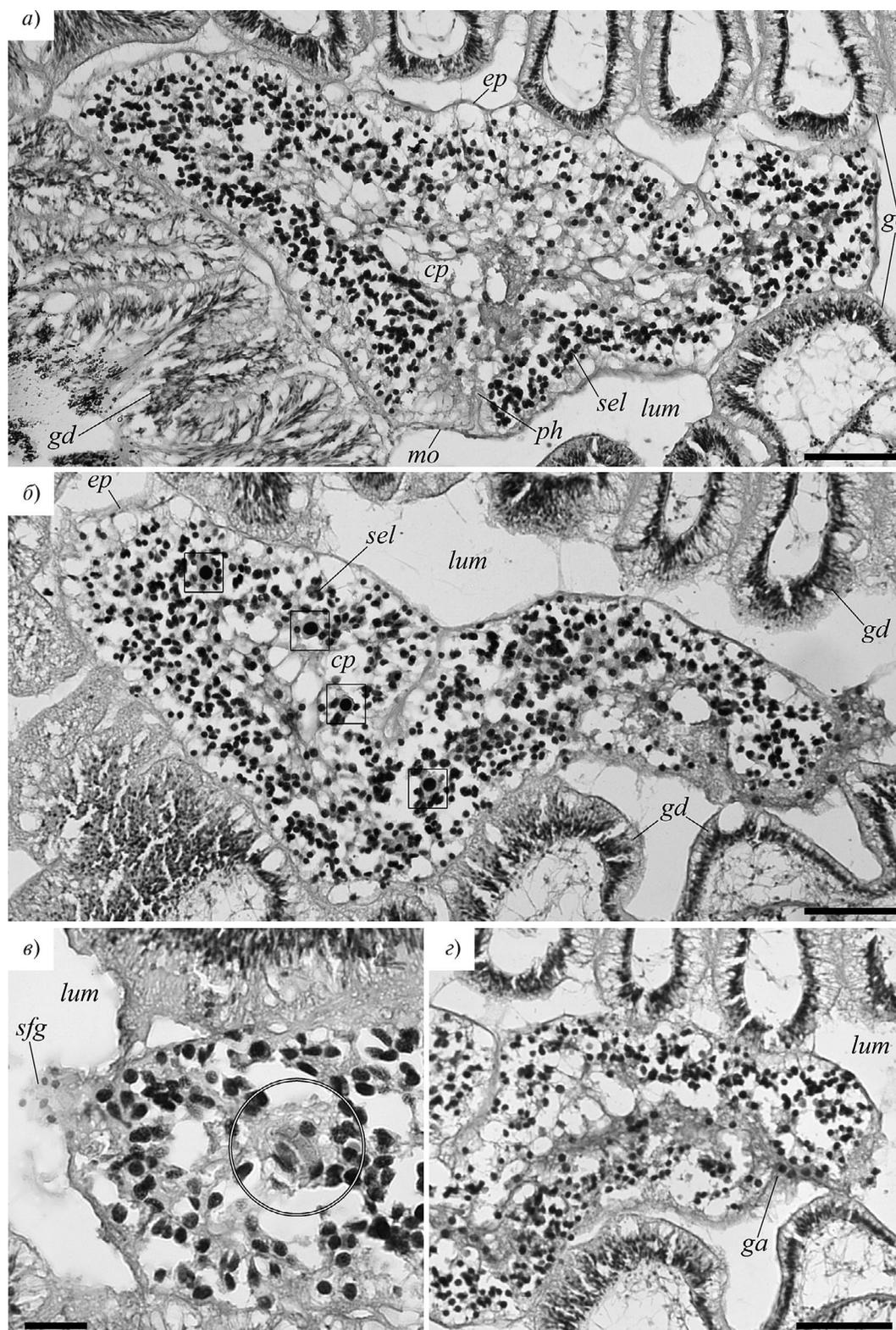
Авторы выражают глубокую благодарность Национальному научному центру морской биологии им. А. В. Жирмунского (ННЦМБ) ДВО РАН, предоставившему материал для настоящей работы. Авторы признательны Е. М. Крыловой, С. В. Галкину и А. В. Гебруку (Институт океанологии им. П. П. Ширшова РАН) за сопровождение материала для исследования. Гистологическое изучение материала проведено в студенческой лаборатории эволюционной морфологии животных (www.evolmorphan.ru) кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ 23-24-00066.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы использования животных были соблюдены. В соответствии с пунктом 3 главы 1 Директивы 2010/63/ЕС от 22.09.2022 г. о защите животных, используемых в научных целях, требования биоэтики не распространяются на объект данного исследования.



Гистологические срезы симбионтов в печеночном отделе кишечника *Quatuoralisia malakhovi*: (а) – продольный срез со ртом (*mo*) и глоткой (*ph*); (б) – продольный срез с гониями (показаны квадратными рамками); (в) – участок поперечного среза переднего конца с предполагаемым статоцистом (показан круговой рамкой); (з) – участок продольного среза с половым атриумом (*ga*). Масштаб (а, б, з) – 100 мкм, (в) – 20 мкм; *cp* – центральная паренхима симбионта; *ep* – покровный эпителий симбионта; *ga* – половой атриум; *gd* – гастродермис хозяина; *lum* – просвет кишечника хозяина; *mo* – рот; *ph* – глотка; *sel* – субэпидермальный слой симбионта; *sfg* – секрет фронтальных желез.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

У авторов нет финансовых или каких-либо иных конфликтов интересов. Все авторы прочли финальную версию рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Holland N.D., Clague D.A., Gordon D.P., et al. 'Lophenteropneust' hypothesis refuted by collection and photos of new deep-sea hemichordates // Nature. 2005. Vol. 434. P. 374–376.
- Osborn K.J., Kuhnz L.A., Priede I.G., et al. Diversification of acorn worms (Hemichordata, Enteropneusta) revealed in the deep sea // Proc. R. Soc. B. 2012. Vol. 279. P. 1646–1654.
- Osborn K.J., Gebruk A.V., Rogacheva A., et al. An externally brooding acorn worm (Hemichordata, Enteropneusta, Torquaratoridae) from the Russian Arctic // Biol. Bull. 2013. Vol. 225. P. 113–123.
- Priede I.G., Osborn K.J., Gebruk A.V., et al. Observations on torquaratorid acorn worms (Hemichordata, Enteropneusta) from the North Atlantic with descriptions of a new genus and three new species // Invert. Biol. 2012. Vol. 131. № 3. P. 244–257.
- Holland N.D., Hiley A.S., Rouse G.W. A new species of deep-sea torquaratorid enteropneust (Hemichordata): a sequential hermaphrodite with exceptionally wide lips // Invert. Biol. 2022. Vol. 141. e12379.
- Smith K.L.J., Holland N.D., Ruhl H.A. Enteropneust production of spiral fecal trails on the deep-sea floor observed with time-lapse photography // Deep Sea Res. I. 2005. Vol. 52. P. 1228–1240.
- Rybakova E., Galkin S., Gebruk A., et al. Vertical distribution of megafauna on the Bering Sea slope based on ROV survey // PeerJ. 2020. Vol. 8. e8628.
- Ежова О.В., Белолюбская К.И., Крупенко Д.Ю. и др. Первая находка трематод (Digenea) в глубоководных кишечнодышащих Torquaratoridae (Hemichordata, Enteropneusta) // Доклады РАН. Науки о жизни. 2022. Т. 503. С. 133–137.
- Ehlers U. Comparative morphology of statocysts in the Plathelminthes and the Xenoturbellida // Hydrobiologia. 1991. Vol. 227. P. 263–271.
- Zhang Z.-Q., Hooper J., Soest R., et al. Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and taxonomic richness // Zootaxa. 2011. Vol. 3148. P. 24–25.
- Brusca R.C., Moore W., Shustes S.M. Invertebrates. Introduction to the Bilateria and the Phylum Xenacoelomorpha: triploblasty and bilateral symmetry provide new avenues for animal radiation. Sinauer Associates, Inc. 2016. Ch. 9. P. 345–372.
- Haszprunar G. Review of data for a morphological look on Xenacoelomorpha (Bilateria incertae sedis) // Org. Divers. Evol. 2016. Vol. 16. P. 363–389.
- Ezhova O.V., Lukinykh A.I., Galkin S.V., et al. Deep-sea acorn worms (Enteropneusta) from the Bering Sea with the description of a new genus and a new species of Torquaratoridae dominating soft-bottom communities // Deep-Sea Res. II. 2022. 105014.
- Ezhova O.V., Trukhan M.A., Lukinykh A.I., et al. Digestive system and feeding of deep-sea acorn worm *Quatuoralisia malakhovi* (Enteropneusta: Torquaratoridae) from the Bering Sea // Deep-Sea Res. I. 2023. (in press).
- Rodkina S.A. The fatty acid composition of the deep-sea acorn worm *Quatuoralisia malakhovi* Ezhova et Lukinykh, 2022 (Hemichordata, Enteropneusta) // Rus. J. Mar. Biol. 2023. Vol. 49. № 4. P. 326–329.
- Rodkina S.A., Kiyashko S.I., Mordukhovich V.V. Diet of deep-sea holothurians in the Volcanologists Massif, Bering Sea, as inferred from stable isotope and fatty acid analyses // Deep-Sea Res. II. 2023. 105266.
- Jangoux M. Diseases of echinodermata. II. Agents metazoans (Mesozoa to Bryozoa) // Dis. Aquat. Org. 1987. Vol. 2. P. 205–234.
- Беклемишев В.Н. О паразитных турбелляриях Мурманского моря. Ч. 1: Асоела // Труды Петроградского Об-ва естествоиспытателей. 1916. С. 103–172.
- Westblad E. On *Meara stichopi* (Bock) Westblad, a new representative of Turbellaria Archoophora // Ark. Zool. 1949. Vol. 1. P. 43–57.

NEMERTODERMATID ENDOSYMBIONTS OF DEEP-SEA ACORN WORMS (HEMICHORDATA, TORQUARATORIDAE)

O. V. Ezhova^{a,*}, A. I. Lukinykh^a, Academician of the RAS V. V. Malakhov^a

^aLomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

*E-mail: olga_ejova@mail.ru

Worm-like endosymbionts were found in the hepatic region of a deep-sea acorn worm, a representative of the family *Torquaratoridae* *Quatuoralisia malakhovi* [Ezhova et Lukinykh, 2022] from the Bering Sea. Histological study of the symbionts allows us to attribute them to the taxon Nemertodermatida. Torquaratorids are similar in type of feeding to holothuroids, in which the xenacoelomorph endosymbionts have also been found.

Keywords: Xenacoelomorpha, *Quatuoralisia malakhovi*, Enteropneusta, histological structure, Bering Sea.

УДК 577.29

МОДУЛЬ RRE-REV НЕ ОКАЗЫВАЕТ ВЛИЯНИЯ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ УПАКОВКИ БЕЛКОВ CAS9 И GAG В ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ СИСТЕМЫ NANOMEDIC

© 2024 г. Н.А. Круглова¹, Д.С. Комков^{1,2}, Д.В. Мазуров^{1,3}, М.В. Шепелев^{1,*}
Представлено академиком РАН П.Г. Георгиевым

Поступило 22.11.2023 г.

После доработки 30.11.2023 г.

Принято к публикации 01.12.2023 г.

Доставка рибонуклеопротеиновых комплексов нуклеазы Cas9 и гидовой РНК в клетки-мишени в формате вирусоподобных частиц (VLP, virus-like particles) – один из новых методов геномного редактирования, в перспективе пригодный для генной терапии заболеваний человека. Эффективность редактирования генома с помощью VLP зависит от упаковки в них нуклеазы Cas9, что опосредуется вирусным белком Gag. Для улучшения упаковки Cas9 в VLP системы NanoMEDIC плазмидные конструкции для экспрессии Cas9 и Gag были модифицированы добавлением элемента RRE (Rev response element) вируса ВИЧ, который должен повышать экспорт RRE-содержащих транскриптов из ядра в цитоплазму за счет аксессуарного белка Rev, как описано для системы VLP на основе Vpr-Cas9. Было установлено, что уровни белков Cas9 и Gag в лизатах клеток повышаются при котрансфекции как плазмиды для экспрессии Rev, так и контрольной пустой плазмиды, и этот эффект не зависит от наличия RRE-элемента в транскрипте. Кроме того, установлено, что основную роль при упаковке Cas9 в частицы системы NanoMEDIC играет AP21967-индуцированная димеризация FRB и FKBP12, но не модификация плазмид с помощью элемента RRE и/или котрансфекция плазмиды, экспрессирующей Rev. Полученные результаты указывают на нецелесообразность использования RRE-Rev модуля для улучшения упаковки нуклеазы Cas9 в VLP.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, VLP, RNP, ВИЧ, RRE, Rev.

DOI: 10.31857/S2686738924020121, EDN: WFAFTA

Развитие технологий редактирования генома человека с помощью системы CRISPR/Cas9 позволило начать разработки лекарственных средств для лечения ряда заболеваний человека, многие из которых уже находятся на различных стадиях клинических исследований [1]. Это обуславливает актуальность создания эффективных технологий доставки компонентов системы CRISPR/Cas9 в клетки человека [2]. Один из таких методов до-

ставки – вирусоподобные частицы (VLP, virus-like particles) на основе оболочечных вирусов: лентивируса ВИЧ или γ -ретровируса MLV [3]. VLP представляют собой вирусные частицы, собранные из структурных белков и содержащие некоторые вирусные ферменты, но лишённые вирусного генома и аксессуарных белков. На своей поверхности VLP несут белок оболочки, чаще всего гетерологичный белок VSVG из вируса везикулярного стоматита (VSV). За счет этого VLP могут эффективно проникать в клетки, доставляя компоненты системы редактирования генома [3]. Различные варианты VLP для доставки комплекса белка Cas9 и гидовой РНК (рибонуклеопротеиновый комплекс, РНКП) были описаны в ряде недавних работ [4–8]. При этом одна из лимитирующих стадий получения VLP – это упаковка в них нуклеазы Cas9. Большинство вариантов систем сборки VLP основано на слиянии нуклеазы Cas9 с полипротеином Gag вирусов ВИЧ или MLV [6–8]. Нуклеаза Cas9 упаковывается в частицы в составе слитого белка с Gag, и после формирования частицы вирусные протеазы расщепляют

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

²Место работы в настоящее время: Department of Physiology and Cell Biology, Faculty of Health Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Be'erSheva, Israel

³Место работы в настоящее время: Division of Infectious Diseases and International Medicine, Department of Medicine, University of Minnesota, Minneapolis, USA

*E-mail: mshepelev@mail.ru

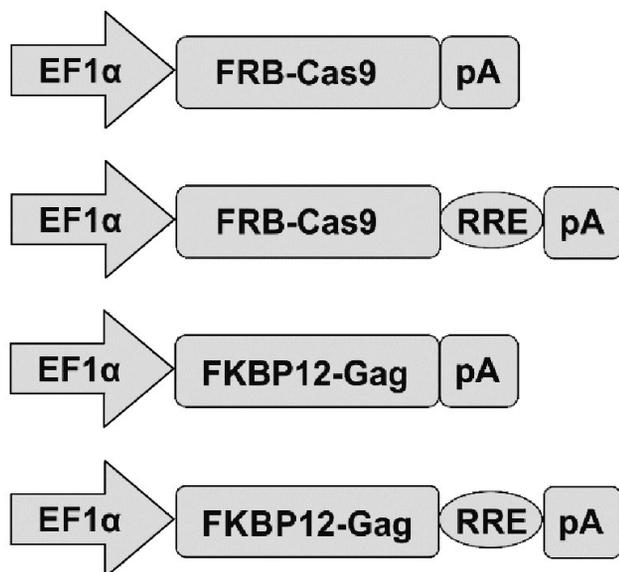


Рис. 1. Схемы плазмидных конструкций для получения VLP системы NanoMEDIC. Плазмиды pHLS-EF1 α -FRB-SpCas9-A и pHLS-EF1 α -FKBP12-Gag(HIV) модифицировали путем добавления элемента RRE вируса ВИЧ-1 (RRE) между кодирующей последовательностью (FRB-Cas9 или FKBP12-Gag) и сигналом полиаденилирования (pA). EF1 α – промотор гена EEF1A1 человека.

слитый белок, высвобождая Cas9. Было обнаружено, что протеаза вируса ВИЧ способна частично разрушать нуклеазу Cas9 [5]. Для предотвращения деградации Cas9 была разработана система сборки VLP NanoMEDIC, в которой упаковка Cas9 в VLP основана на димеризации Cas9, слитой с доменом FRB (FRB-Cas9), с белком Gag из вируса ВИЧ, слитым с доменом FKBP12. В присутствии рапамицина или его аналогов домены FKBP12 и FRB димеризуются, в результате чего нуклеаза Cas9 привлекается в упаковываемые частицы, а в клетках-мишенях концентрация димеризатора падает, и Cas9 высвобождается из комплекса с Gag [5].

Геном ретровирусов содержит так называемые Rev response element (RRE), которые необходимы для экспорта несплайсированных вирусных транскриптов из ядра в цитоплазму. У вируса ВИЧ аксессуарный белок Rev связывается с RRE и помогает экспорту по CRM1-зависимому пути [9]. У более простых ретровирусов молекулы РНК-генома содержат так называемые constitutive transport elements (CTEs), которые привлекают компоненты NXF1/NXT1-зависимого пути экспорта вирусных транскриптов. Есть данные о том, что добавление RRE элемента к транскрипту в присутствии белка Rev значительно ускоряет экспорт транскрипта в цитоплазму и приводит к более быстрому накоплению белка-репортера [10]. Подобное наблюдение было сделано и для CTE сигнала вируса М-PMV

[10]. В работе [Indikova et al., 11] была предложена система для сборки VLP на основе слитого белка Vpr-Cas9, и для повышения эффективности сборки VLP в генетическую конструкцию, кодирующую Vpr-Cas9, были добавлены элементы RRE или CTE. Оказалось, что RRE-Rev модуль примерно в два раза повышал уровень упаковки Vpr-Cas9 в VLPs по сравнению с CTE-сигналом [11]. Однако в данной работе не проводилось сравнение эффективности упаковки Vpr-Cas9 в VLP между конструкциями несущими RRE или CTE и без таковых [11]. Таким образом, остается непонятным, каков был вклад RRE-Rev модуля в улучшенную упаковку Vpr-Cas9 в VLP по сравнению с конструкциями без RRE. В данной работе мы решили выяснить, можно ли повысить эффективность упаковки нуклеазы Cas9 и белка Gag в VLP системы NanoMEDIC за счет RRE-Rev-зависимого экспорта транскриптов из ядра. Для этого был оценен эффект добавления RRE-элементов в генетические конструкции, кодирующие FRB-Cas9 и FKBP12-Gag, на уровень соответствующих белков в клеточных лизатах и VLP системы NanoMEDIC.

Вначале на основе ранее описанных плазмид системы NanoMEDIC pHLS-EF1 α -FRB-SpCas9-A (Addgene # 138477) и pHLS-EF1 α -FKBP12-Gag(HIV) (Addgene # 138476), любезно предоставленных [Akitsu Hotta, 5], были получены конструкции, несущие элемент RRE вируса ВИЧ-1 между кодирующей последовательностью и сигналом полиаденилирования (рис. 1). Для этого элемент RRE амплифицировали в ПЦП на матрице плазмиды pUCHR (описана ранее в [12]) с праймерами 5'-EcoRI-BstBI-RRE(5-CCGAATTCGAAGAGCAG TGGGAATAGGAGC-3) и 3'-PspXI-RRE (5-CGAC TCGAGGAGCTGTTGATCCTTTAGG-3) и клонировали по сайтам EcoRI/PspXI в pHLS-EF1 α -FRB-SpCas9-A или по сайтам BstBI/PspXI в вектор pHLS-EF1 α -FKBP12-Gag(HIV). Далее оценивали эффект от введения RRE элементов на уровень продукции белков FRB-Cas9 и FKBP12-Gag при транзитной трансфекции в клетки линии HEK293T (получены из NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, США), которые культивировали при 37 °C в увлажненной атмосфере в присутствии 5% CO₂ в среде Dulbecco's modified Eagle's medium (HyClone, #SH30285.01), содержащей 10%-ю фетальную бычью сыворотку (HyClone, США, #SV30160.03), 2 mM L-глутамин (Gibco, США, #25003-024), 1000 ед./мл пенициллина и 1000 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США, 15140-122) и 400 мкг/мл G418 сульфата (Calbiochem, Германия, #345812). Клетки рассевали в 24-х луночные планшеты (Costar, США, #3524) в плотности 100-150 тыс. в лунку, и трансфицировали плазмидами для экспрессии FRB-Cas9 или FKBP12-Gag, содержащими RRE элемент или без такового, вместе с плазмидой для экспрессии

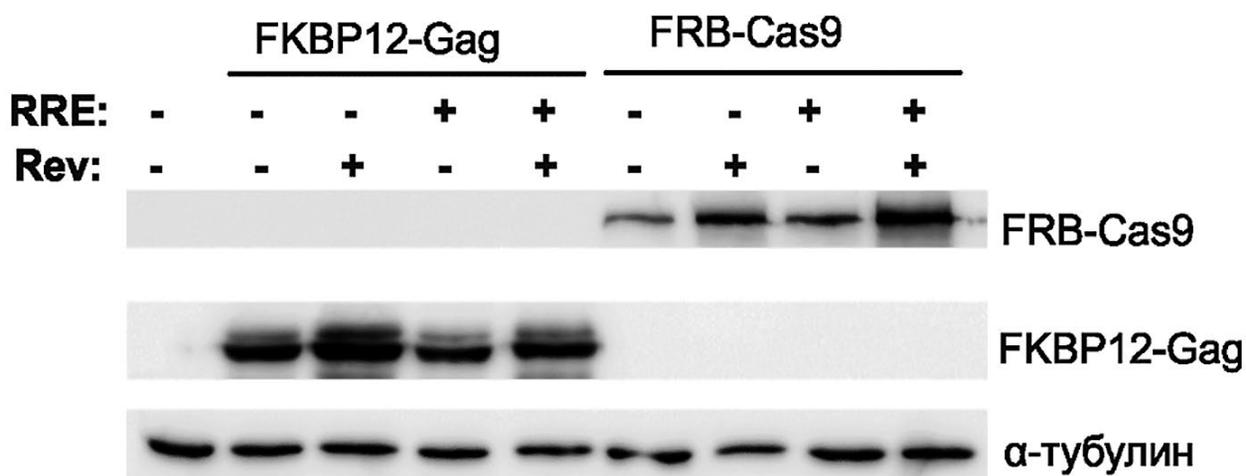


Рис. 2. Влияние экспрессии белка Rev на уровень продукции FRB-Cas9 и FKBP12-Gag. Лизаты клеток HEK293T, трансфицированных плазмидами для экспрессии FRB-Cas9 и FKBP12-Gag с элементами RRE (RRE+) или без таковых (RRE-) вместе с плазмидой для экспрессии белка Rev (Rev+) или контрольной плазмидой pBluescriptSKII(-) (Rev-), анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с антителами к HA-эпитопу (FRB-Cas9), белку ВИЧ p27 (FKBP12-Gag) и α -тубулину для контроля суммарного уровня белка в лизатах клеток. Показаны результаты одного из двух репрезентативных экспериментов.

белка Rev (pRSV-Rev, Addgene #12253, любезно предоставлена Дидье Троне и описана ранее [13] или вместе с контрольной плазмидой pBluescriptSKII(-) (Stratagene, США), которая не содержит функциональных генетических элементов млекопитающих, в соотношении 1:1. Клетки трансфицировали, используя реагент GenJect™-39 (Moloca, Россия) в соответствии с протоколом производителя, используя 500 нг плазмидной ДНК на лунку. Через 48 ч после трансфекции клетки лизировали в 1-кратном буфере для ДСН-ПААГ и полученные лизаты анализировали с помощью вестерн-блоттинга с мышинными моноклональными антителами к белку p17 HIV Type 1 клон 32/5.8.42 (Zeptomatrix, США, #0801005) в разведении 1:2500, мышинными моноклональными антителами к α -тубулину, клон DM1 α (Sigma-Aldrich, США, #T6199), в разведении 1:2000, и кроличьими поликлональными антителами к HA-эпитопу для детекции Cas9 (Cell Signaling, Нидерланды, #3724S), разведение 1:2000. Хемилуминесцентный сигнал детектировали с помощью системы гель-документации ChemiDoc MP (Bio-Rad, США), используя набор реагентов Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, США). Денситометрический анализ результатов вестерн-блоттинга проводили с помощью программы Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad). В результате было установлено, что котрансфекция плазмиды для экспрессии белка Rev приводила к 1.76-кратному повышению уровня FRB-Cas9-RRE в клеточных лизатах (рис. 2, FRB-Cas9, образцы Rev+ RRE+). Неожиданно, более выраженный эффект (3-кратное повышение уровня белка FRB-Cas9) отмечался в случае транскрипта без элемента RRE (см. рис. 2, FRB-Cas9,

образцы Rev+ RRE-). Для белка FKBP12-Gag было выявлено незначительное повышение уровня белка примерно в 1.2-раза при котрансфекции плазмиды для экспрессии Rev, также не зависящее от наличия в транскрипте элемента RRE (рис. 2, FKBP12-Gag, Rev+ и Rev-). Полученные результаты указывают либо на неспецифический эффект от котрансфекции плазмиды pRSV-Rev, либо на то, что эффект от экспрессии белка Rev не зависит от его способности стимулировать экспорт мРНК из ядра за счет связывания с RRE элементами.

Для проверки этих гипотез был проведен контрольный эксперимент, в котором плазмиды для экспрессии FRB-Cas9 и FRB-Cas9-RRE котрансфицировали вместе с плазмидой pRSV-Rev (рис. 3, Rev) или с контрольными плазмидами pBluescriptSKII(-) (pBI), pCMV-pA (CMV) и pEYFP-N1 (Clontech, США) (EYfp). Плазмида pCMV-pA получена ранее в лаборатории и содержит промотор цитомегаловируса человека и сигнал полиаденилирования вируса SV40, но не содержит кДНК. Плазмида pEYFP-N1 экспрессирует флуоресцентный белок EYfp под контролем промотора CMV и сигнала полиаденилирования вируса SV40. В результате было установлено, что уровень белка FRB-Cas9 повышался при котрансфекции как pRSV-Rev (в 1.66 для FRB-Cas9 и в 1.25 для FRB-Cas9-RRE), так и контрольной плазмиды pCMV-pA (в 1.39 для FRB-Cas9 и в 1.9 для FRB-Cas9-RRE), независимо от присутствия в транскрипте элемента RRE (рис. 2a). Таким образом, наблюдаемый эффект на уровень белка FRB-Cas9, по всей видимости, не связан с взаимодействием белка Rev с RRE-элементом, а яв-

ляется следствием неспецифического эффекта при котрансфекции плазмиды.

Дополнительно были получены плазмиды на основе pRSV-Rev с нарушенной кодирующей последовательностью белка Rev. Для этого плазмиду pRSV-Rev либо обрабатывали рестриктазой BamHI, после чего липкие концы плазмиды достраивали с помощью фрагмента Кленова и лигировали вектор сам на себя. В результате в кодирующей последовательности Rev образуется преждевременный стоп-кодон, таким образом экспрессируется укороченный белок Rev с 1 по 61 аминокислоту (RevΔB). В другом варианте плазмиду pRSV-Rev обрабатывали рестриктазами PspXI-BamHI, удаляя N-концевой фрагмент белка Rev вместе со старт-кодоном (RevΔBP). Полученная плазида не содержит старт-кодон в одной рамке считывания с C-концевой частью белка Rev и не должна экспрессировать даже минимальные фрагменты этого белка. В результате трансфекции полученных плазмид вместе с FRB-Cas9 было обнаружено 2-кратное повышение уровня FRB-Cas9 при экспрессии Rev, но не RevΔB или RevΔBP (см. рис. 2б). Полученный результат указывает на то, что помимо неспецифического эффекта от транзитной трансфекции, наблюдаемый эффект от трансфекции плазмиды pRSV-Rev частично может быть связан с функцией Rev, не ассоциированной с влиянием на экспорт мРНК из ядра. Однако для FRB-Cas9-RRE в данном эксперименте не было обнаружено существенного эффекта от котрансфекции плазмид с Rev (см. рис. 2б). С одной стороны, это противоречит результатам на рис. 1 и 2а, но с другой стороны, эффект от экспрессии Rev в этих экспериментах составлял всего 1.75 и 1.25. Поэтому варибельность результатов может быть обусловлена малой величиной наблюдаемого эффекта при котрансфекции плазмиды для экспрессии Rev вместе с FRB-Cas9-RRE либо быть артефактом транзитной трансфекции (см. ниже).

Для выявления эффекта RRE-Rev модуля на упаковку Cas9 и Gag в VLP системы NanoMEDIC получали VLP, используя плазмиды для экспрессии соответствующих белков с RRE элементом или без такового в присутствии или отсутствии плазмиды для экспрессии Rev. В частности, для продукции VLP $2 \cdot 10^5$ клеток HEK293T рассеивали в лунки 12-луночного планшета в 1 мл полной среды (DMEM/F12 ("ПанЭко", Россия) с добавлением 10% фетальной сыворотки телят (HyClone), 4 mM L-глутамин и 40 мг/л гентамицин ("ПанЭко"). Через 24 ч клетки трансфицировали, используя 0.1 мкг плазмиды pHLF-EF1α-FRB-Cas9 или pHLF-EF1α-FRB-Cas9-RRE, 0.1 мкг плазмиды pHLS-EF1α-FKBP12-Gag или pHLS-EF1α-FKBP12-Gag-RRE, 0.04 мкг плазмиды pCMV-VSV-G (Addgene

#8454, любезно предоставлена Бобом Вайнбергом и описана ранее [14]), 0.08 мкг pKSgRNA-GFPt (плазида для экспрессии гидовой РНК, направленной к кДНК белка TurboGFP, мишень: GATGCGGCACTCGATCTCCATGG) с добавлением 0.1 мкг плазмиды pRSV-Rev или pBluescriptII KS (+). Для трансфекции использовали трансфекционный реагент GenJect-39 ("Молекта") в соотношении 1:2 (мкг ДНК : мкл GenJect) и среду OptiMEM (Gibco). Через 4 ч после добавления к клеткам комплексов ДНК/GenJect среду меняли на свежую, предварительно прогретую до 37°C, для образцов с димеризатором в среду добавляли реагент AP21967 (Takara Bio Inc., Япония) до конечной концентрации 300 нМ.

Для получения препарата VLP через 48 ч после трансфекции отбирали супернатант, центрифугировали его 5 мин при 3600 g, после чего переносили в новые пробирки и центрифугировали при 4 °C и 21 000 g в течение 2.5 ч. Супернатант отбирали, оставляя около 15 мкл жидкости над осадком, содержащим VLP. Суммарный объем доводили до 20 мкл с помощью OptiMEM (Gibco), смешивали с 4-кратным буфером для ДСН-ПААГ (250 mM Трис-HCl, pH = 6.8, 40%-ный глицерин, 8%-ный ДСН, 4%-ный 2-меркаптоэтанол и 0.2%-ный бромфеноловый синий) и инкубировали в течение 5 мин при 80 °C. Параллельно клетки-продуценты вирусоподобных частиц трипсинизировали с помощью раствора трипсина-ЭДТА 0.05% ("ПанЭко"), отмывали в буфере PBS, суспендировали на холоду в 120 мкл лизирующего буфера, содержащего 20 mM Трис-HCl pH = 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM ЭДТА, 1% (w/v) "Тритон X-100", 1 mM фенилметилсульфонилфторида и инкубировали при 4 °C 15 мин. Затем лизаты центрифугировали 10 мин при 4 °C и 12 000 g, после чего супернатанты смешивали с 4-кратным буфером образца для ДСН-ПААГ и инкубировали в течение 5 мин при 80 °C.

Далее проводили вестерн-блот-анализ полученных препаратов VLP и лизатов клеток-продуцентов с антителами к НА-эпитопу, белку Gag и α-тубулину. В результате было установлено, что обработка клеток веществом AP21967, вызывающим димеризацию FRB и FKBP12, приводит к примерно 2-3-кратному повышению уровня упаковки Cas9 в VLP, что было описано ранее для системы NanoMEDIC [5] (рис. 4, образцы AP+). При этом уровень упаковки Cas9 в VLP в образцах без добавления AP21967 был примерно в два раза выше для RRE-транскриптов, но не зависел от присутствия Rev. В образцах, обработанных AP21967, уровень Cas9 существенно не различался между образцами с RRE и без такового. Анализ клеточного лизата выявил повышение уровня белка Cas9 примерно в два раза во всех образцах, трансфицированных

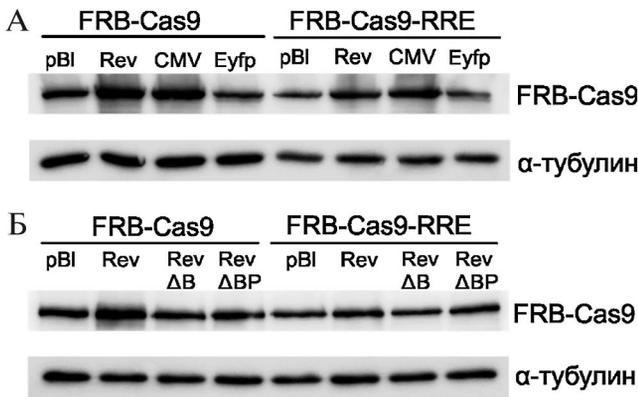


Рис. 3. Оценка специфичности эффекта от экспрессии белка Rev на уровень продукции FRB-Cas9. Лизаты клеток HEK293Т, трансфицированных плазмидами для экспрессии FRB-Cas9 с элементами RRE или без таковых (RRE-) вместе с плазмидами (а) для экспрессии белков Rev и Eyfp или контрольными плазмидами pBluescriptSKII(-) (pBI) и pCMV-pA (CMV), или (б) для экспрессии белка Rev, его укороченной формы (RevΔB), плазмиды с делецией N-концевой части кДНК Rev (RevΔBP) и контрольной плазмиды (pBI) анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с антителами к HA-эпитопу (FRB-Cas9) и α-тубулину для контроля суммарного уровня белка в лизатах клеток. Показаны результаты одного из двух репрезентативных экспериментов.

упаковки Cas9 в VLP в клетках, трансфицированных RRE плазмидами и не обработанных AP21967, обусловлен повышением уровня Cas9 в лизатах. Кроме того, при получении VLP для трансфекции используется смесь из четырех плазмид, поэтому возможное влияние плазмиды pRSV-Rev на уровень белка FRB-Cas9 в данных условиях может быть менее выражено по сравнению с экспериментами с котрансфекцией двух плазмид.

Таким образом, было установлено, что лишь обработка клеток димеризатором AP21967 оказывала существенный эффект на уровень упаковки Cas9 в VLP. Присутствие элемента RRE повышало уровень Cas9 в лизатах и уровень упаковки Cas9 в VLP без обработки димеризатором AP21967, однако при добавлении AP21967 уровень упаковки Cas9 в VLP был примерно одинаков во всех образцах. Это свидетельствует о том, что основную роль при упаковке Cas9 в частицы системы NanoMEDIC играет именно AP21967-индуцированная димеризация FRB и FKBP12, но не модификация плазмид с помощью элемента RRE или ко-трансфекция плазмиды, экспрессирующей Rev.

Доставка РНП с помощью VLP для редактирования генома с терапевтическими целями сходна по эффективности с электропорацией РНП [7]. При этом VLP можно псевдотипировать различными белками вирусной оболочки, тем самым направляя в определенный тип клеток *in vivo* [7]. Наконец, доставка РНП снижает вероятность редактирования нецелевых локусов из-за быстрой деградации белка Cas9, а также элиминирует риск инсерционного мутагенеза из-за отсутствия вирусного генома [15]. Все это в совокупности определяет актуальность развития методов эффективной продукции VLP.

В данной работе был оценен эффект от модификации транскриптов элементами RRE для повышения упаковки FRB-Cas9 и FKBP12-Gag в частицы системы NanoMEDIC в присутствии акцессорного белка Rev. Было выявлено, что транзиторно котрансфицируемые плазмиды, как для экспрессии Rev, так и контрольные, не содержащие кДНК, могут неспецифически влиять на уровни белков Cas9 и Gag в клеточных лизатах. При этом эффект не зависит от наличия элемента RRE в этих плазмидах. Известно, что при транзиторной котрансфекции плазмидных векторов могут наблюдаться различные артефакты, включая активацию репортерных генов пустыми плазмидными векторами [16], а также ряд других парадоксальных эффектов (см. обзор [17]). Это может объяснить полученные в данной работе результаты.

Влияние модуля RRE-Rev на уровень упаковки нуклеазы Vpr.Prot.Cas9 в VLP было показано в ра-

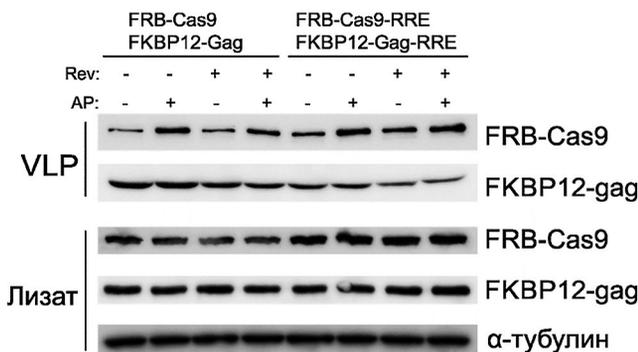


Рис. 4. Влияние RRE-элементов на упаковку нуклеазы Cas9 в VLP системы NanoMEDIC. VLP получали, как описано в тексте, используя плазмиды для экспрессии FRB-Cas9 и FKBP12-Gag с элементами RRE или без таковых в присутствии белка Rev (Rev+) или без белка Rev (Rev-). Для индукции димеризации FRB и FKBP12 клетки обрабатывали веществом AP21967 в концентрации 300 нМ (AP+) или ДМСО (AP-). Через 48 ч после трансфекции получали лизаты VLP и клеток-продуцентов и анализировали их с помощью Вестерн-блоттинга с антителами к HA-эпитопу (FRB-Cas9), белку ВИЧ p17 (FKBP12-Gag) и α-тубулину для контроля суммарного уровня белка в лизатах клеток. Показаны результаты одного из двух репрезентативных экспериментов.

плазмидами с RRE элементом, не зависящее от присутствия Rev (см. рис. 4, панель лизаты, FRB-Cas9). По всей видимости повышенный уровень

боте [Indikova et al, 11]. Уровень упаковки Vpr.Prot. Cas9 в VLP был в два раза выше для RRE по сравнению со СТЕ-элементом, однако уровень Vpr.Prot. Cas9 в лизатах не различался между транскриптами с СТЕ и RRE элементами. Важно отметить, что в данной работе не проводилось сравнения с контрольным транскриптом, не содержащим RRE или СТЕ элементы. В качестве источника белка Rev авторы использовали плазмиды pRSV-Rev и упаковочную плазмиду psPAX2, несущую также гены gag и pol. Наличие двух плазмид, кодирующих Rev, вероятно, обеспечивает более высокий уровень белка Rev по сравнению с нашей экспериментальной системой. Однако и в этом случае отсутствовал необходимый контроль в виде оценки упаковки Vpr.Prot.Cas9-RRE в VLP в отсутствие плазмиды pRSV-Rev. Таким образом, отсутствие важных контролей, а также вероятность детекции артефактов транзитной котрансфекции не позволяют сделать вывод о необходимости модуля RRE-Rev для повышения эффективности упаковки Vpr.Prot.Cas9. Результаты нашей работы указывают на то, котрансфекция не только pRSV-Rev, но и контрольных плазмид, не экспрессирующих Rev, обладает неспецифическим эффектом на уровень экспрессии FRB-Cas9 в лизатах, и это не зависит от наличия RRE элемента в транскрипте. Более того, было обнаружено, что именно AP21967-индуцированная димеризация FRB и FKBP12 играет основную роль при упаковке Cas9 в частицы системы NanoMEDIC, но не модификация плазмид с помощью элемента RRE или котрансфекция плазмиды, экспрессирующей Rev.

В настоящий момент основной способ получения VLP – это транзитная котрансфекция нескольких плазмид [4, 5, 7, 11]. Результаты данной работы указывают на нецелесообразность использования RRE-Rev модуля для повышения упаковки нуклеазы Cas9 в VLP системы NanoMEDIC. Полученные артефактные результаты при транзитной котрансфекции определенных плазмид указывают на необходимость тщательного контроля условий получения VLP для выявления факторов, повышающих эффективность упаковки нуклеазы Cas9 в VLP. Мы предполагаем, что создание стабильных клеточных линий, экспрессирующих некоторые из компонентов, необходимых для сборки функциональных VLP, может помочь в стандартизации и оптимизации условий получения VLP.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00381).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследований с участием людей и/или животных не проводилось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Doudna J.A. // Nature. 2020. V. 578. № 7794. P. 229–236.
2. Lino C.A., Harper J.C., Carney J.P., Timlin J.A. // Drug Deliv. 2018. V. 25. № 1. P. 1234–1257.
3. Mazurov D., Ramadan L., Kruglova N. // Viruses. 2023. V. 15. № 3. P. 690.
4. Banskota S., Raguram A., Suh S., Du S.W., Davis J.R., Choi E.H., Wang X., Nielsen S.C., Newby G.A., Randolph P.B., et al. // Cell. 2022. V. 185. № 2. P. 250–265.e16.
5. Gee P., Lung M.S.Y., Okuzaki Y., Sasakawa N., Iguchi T., Makita Y., Hozumi H., Miura Y., Yang L.F., Iwasaki M., et al. // Nat Commun. 2020. V. 11. № 1. P. 1334.
6. Mangeot P.E., Risson V., Fusil F., Marnef A., Laurent E., Blin J., Mournetas V., Massouridès E., Sohier T.J.M., Corbin A., et al. // Nat Commun. 2019. V. 10. № 1. P. 45.
7. Hamilton J.R., Tsuchida C.A., Nguyen D.N., Shy B.R., McGarrigle E.R., Sandoval Espinoza C.R., Carr D., Blaeschke F., Marson A., Doudna J.A. // Cell Rep. 2021. V. 35. № 9. P. 109207.
8. Montagna C., Petris G., Casini A., Maule G., Franceschini G.M., Zanella I., Conti L., Arnoldi F., Burrone O.R., Zentilin L., et al. // Mol Ther Nucleic Acids. 2018. V. 12. P. 453–462.
9. Fernandes J., Jayaraman B., Frankel A. // RNA Biol. 2012. V. 9. № 1. P. 6–11.
10. Pockock G.M., Becker J.T., Swanson C.M., Ahlquist P., Sherer N.M. // PLoS Pathog. 2016. V. 12. № 4. P. e1005565.
11. Indikova I., Indik S. // Nucleic Acids Res. 2020. V. 48. № 14. P. 8178–8187.
12. Mazurov D., Ilinskaya A., Heidecker G., Lloyd P., Dersé D. // PLoS Pathog. 2010. V. 6. № 2. P. e1000788.
13. Dull T., Zufferey R., Kelly M., Mandel R.J., Nguyen M., Trono D., Naldini L. // J Virol. 1998. V. 72. № 11. P. 8463–8471.
14. Stewart S.A., Dykxhoorn D.M., Palliser D., Mizuno H., Yu E.Y., An D.S., Sabatini D.M., Chen I.S.Y., Hahn W.C., Sharp P.A., et al. // RNA. 2003. V. 9. № 4. P. 493–501.
15. Han X., Liu Z., Ma Y., Zhang K., Qin L. // Adv Biosyst. 2017. V. 1. № 1–2. P. e1600007.
16. Hu Q., Suzuki K., Hirschler-Laszkiwicz I., Rothblum L.I. // Biotechniques. 2002. V. 33. № 1. P. 74, 76, 78 passim.
17. Stepanenko A.A., Heng H.H. // Mutat Res Rev Mutat Res. 2017. V. 773. P. 91–103.

THE RRE-REV MODULE HAS NO EFFECT ON THE PACKAGING EFFICIENCY OF CAS9 AND GAG PROTEINS INTO NANOMEDIC VIRUS-LIKE PARTICLES

N. A. Kruglova^a, D. S. Komkov^{a, b}, D. V. Mazurov^{a, c}, M. V. Shepelev^{a, #}

Presented by Academician of the RAS P.G. Georgiev

^aCenter for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^bCurrent address: Department of Physiology and Cell Biology, Faculty of Health Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Be'erSheva, Israel

^cCurrent address: Division of Infectious Diseases and International Medicine, Department of Medicine, University of Minnesota, Minneapolis, USA

[#]E-mail: shepelev@mail.ru

Delivery of ribonucleoprotein complexes of Cas9 nuclease and guide RNA into target cells with virus-like particles (VLP) is one of the novel methods of genome editing, suitable for gene therapy of human diseases in the future. Efficiency of genome editing with VLPs depends on the packaging of Cas9 into VLPs, that is mediated by viral Gag protein. To increase the packaging of Cas9 into NanoMEDIC system VLPs plasmid constructs for expression of Cas9 and Gag were modified by the addition of HIV RRE (Rev response element), that is expected to increase the nuclear export of RRE-containing transcripts to cytosol via accessory protein Rev, as described for Vpr-Cas9-based VLP system. Here we found that Cas9 and Gag protein levels in the cell lysates are increased upon cotransfection of either Rev-expressing plasmid or empty control plasmid. Moreover, this effect does not depend on the presence of RRE in the transcript. On the top of that, we showed that AP21967-induced dimerization of FRB and FKBP12, but not the modification of plasmids with RRE and/or cotransfection of Rev-expressing plasmid, plays the major role in packaging of Cas9 into NanoMEDIC system VLPs. These data suggest that it is impractical to use the RRE-Rev module to enhance the packing of Cas9 nuclease into VLPs.

Keywords: CRISPR/Cas9, VLP, RNP, HIV, RRE, Rev.

УДК 599.426: 574.24: 591.111.1

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ КРОВИ ДВУХ МИГРИРУЮЩИХ ВИДОВ РУКОКРЫЛЫХ УРАЛА

© 2024 г. Л. А. Ковальчук^{1,*}, В. А. Мищенко^{1,2}, Л. В. Черная¹, В. П. Снитко³, академик РАН В. Н. Большаков¹

Поступило 29.11.2023 г.

После доработки 10.12.2023 г.

Принято к публикации 13.12.2023 г.

Представлены данные по исследованию функциональной активности системы крови мигрирующих видов фауны Урала: двухцветного кожана и лесного нетопыря. Многомерный непараметрический дисперсионный анализ параметров красной крови мигрирующих видов летучих мышей и оседлого вида прудовой ночницы показал статистически значимые видовые различия ($p < 0.05$). У рукокрылых отмечена определенная генетически детерминированная разнонаправленность в мобилизации механизмов аварийного регулирования лимфоидной системы крови.

Ключевые слова: летучие мыши, мигрирующие виды, периферическая кровь, гранулоциты.

DOI: 10.31857/S2686738924020135, **EDN:** WFAAFF

ВВЕДЕНИЕ

На Урале обитает 13 видов летучих мышей, из которых девять видов зимуют в районах летних местообитаний, а четыре вида мигрируют на дальние расстояния [1–2]. Из перелетных видов наиболее исследованы два – двухцветный кожан (*Vespertilio murinus* [Linnaeus, 1758]) и лесной нетопырь (*Pipistrellus nathusii* [Keyserling et Blasius, 1839]) [3]. Направления перелетов рукокрылых, их дальность и места зимовок в настоящее время точно не установлены, однако они могут быть весьма значительны [4–5]. Исследователи отмечают, что мигрирующие виды летучих мышей сталкиваются с многочисленными природными факторами, включая изменения климата [6, 7], потерю и фрагментацию среды обитания под усиливающимся техногенным прессом [8, 9], что существенным образом влияет

на их эврибионтность и выживание [10–12]. Учитывая, что устойчивая адаптация обеспечивается оптимально отрегулированными эколого-физиологическими процессами, значительный интерес приобретает изучение в сравнительном варианте системы крови мигрирующих и оседлых видов рукокрылых. Ранее авторами дана оценка гематологических параметров крови оседлого вида фауны Урала *Myotis dasycneme* [Voie, 1825] [13]. Представленные в настоящей статье материалы являются результатом исследований функциональной активности системы крови мигрирующих видов рукокрылых Урала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемая группа представлена сеголетками двух видов мигрирующих летучих мышей: лесного нетопыря (*P. nathusii*) и двухцветного кожана (*V. murinus*). Лесной нетопырь широко распространен в зонах широколиственных и смешанных лесов с наличием водоемов, а двухцветный кожан тяготеет к открытым пространствам лесостепной зоны Урала и к селитебным территориям [1]. В летний период года рукокрылые приурочены к интразональным (пойменным, околородным) биотопам, обеспечивающим основные кормовые станции и возможность размещения выводковых колоний. В дневное время, обычно располагаясь в естественных укрытиях, лесной нетопырь и двухцветный кожан зачастую предпочитают неглубокие убежища (дупла деревьев, пещеры и хозяйственные постройки человека). Исследователи отмечают способность этих

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

²Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций “Виром” Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия

³Южно-Уральский федеральный научный центр минералогии и геоэкологии Уральского отделения Российской академии наук, Ильменский государственный заповедник, Миасс, Россия

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

животных к дальним миграциям и к возвращению в места своего прежнего обитания (homing) [14]. У перелетных видов рукокрылых Урала возвращение с зимовки происходит с первой декады мая [1, 2]. В начале июня в Челябинской области отмечено массовое появление лесных нетопырей и двухцветных кожанов в местах их размножения. Рождение детенышей происходит с начала и до конца второй декады июня, вылет молодняка из убежищ наблюдается с конца второй и до середины третьей декады июля; миграция обоих видов к местам зимовок — с конца августа до первых чисел сентября [2].

Отлов и содержание рукокрылых, доставленных в лабораторию, осуществляли согласно международным принципам Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, используемых для экспериментальных и научных целей [15]. Животных для исследования ($n = 34$) отлавливали паутиными сетями на побережье оз. Большой Кисегач и в окрестностях оз. Малое Миассово (Челябинская область) во второй декаде июля (в период выведения потомства) в 2013–2015 гг. Численность двухцветного кожана в Ильменском заповеднике достаточно высока, и его относительное обилие составляет 21.1%, а лесного нетопыря — 7.4% [2]. Для сравнения использовали зимующий на Урале вид — прудовую ночницу, с относительным обилием в Ильменском заповеднике — 45.3%.

Забор крови проводили в стерильные вакуумные пробирки BD Vacutainer с ЭДТА (Великобритания). Параметры периферической крови (400–800 μ l) животных определяли на гематологическом анализаторе BC-5800 (Mindray, Китай). Лейкоцитарную формулу рассчитывали (на 100 лейкоцитов) в мазках крови, окрашенных по Романовскому – Гимзе. На основании лейкоцитарной формулы рассчитывали интегральный лейкоцитарный индекс (ИСЛ – соотношение гранулоцитов и агранулоцитов в отн. ед.), позволяющий оценить физиологическое состояние исследуемых особей и их адаптивный потенциал. Полученные результаты обработаны с использованием пакета лицензионных прикладных программ Statistica for Windows V 10.0. Метод главных компонент (РСА) реализован посредством статистической среды R (R 3.1.2, пакет Ade4) [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование периферической крови летучих мышей показало, что межвидовые различия в гематограммах мигрирующих видов как по содержанию эритроцитов ($p = 0.36$) и гемоглобина ($p = 0.12$), так и по содержанию тромбоцитов ($p = 0.60$) и тромбокриты ($p = 0.89$) отсутствуют, что, несомненно, свидетельствует об идентичности адаптивных механизмов лесного нетопыря и двухцветно-

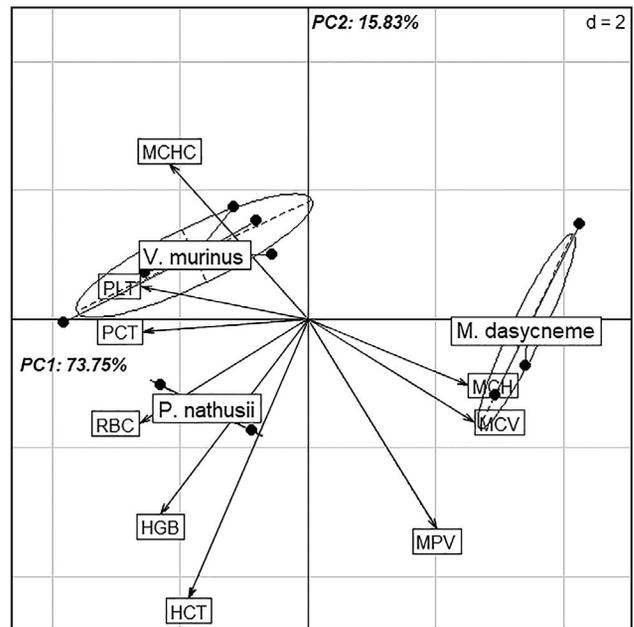


Рис. 1. Показатели красной крови летучих мышей в пространстве двух главных компонент. PC1, PC2 — оси главных компонент, % — процент дисперсии данных, объясненных главной компонентой; стрелки отражают корреляцию главных компонент с исходными показателями; эллипсы представляют собой 95% доверительные области.

го кожана. Животные характеризуются высоким уровнем содержания гемоглобина, гематокрита и эритроцитов, что свидетельствует о высоком уровне дыхательной функции летающих животных [17]. Статистически значимые отличия у прудовой ночницы по параметрам красной крови отмечены относительно лесного нетопыря: для эритроцитов ($RBC = 10.0 \pm 0.03$ Т/л, $p = 0.03$), гемоглобина ($Hb: 148.9 \pm 0.93$ г/л, $p = 0.03$), гематокрита ($HCT: 41.5 \pm 0.05\%$, $p = 0.03$) при средней концентрации гемоглобина в эритроците ($MCHC = 372.2 \pm 1.8$ г/л, $p = 0.02$) и при среднем объеме эритроцита ($MCV = 41.4 \pm 0.07$ фл, $p = 0.03$); и двухцветного кожана: по содержанию эритроцитов ($RBC = 9.2 \pm 0.6$ Т/л, $p = 0.01$), по среднему объему эритроцита ($MCV = 36.8 \pm 0.07$ фл, $p = 0.01$), при средней концентрации гемоглобина в эритроците ($MCHC = 379.6 \pm 7.3$ г/л, $p = 0.02$) [18].

На рис. 1. представлены три самостоятельные группы рукокрылых: мигрирующие виды *V. murinus*, *P. nathusii* и оседлый вид *M. dasycneme*. Анализ главных компонент показал, что 73.75% общей дисперсии параметров красной крови приходится на первую главную компоненту и 15.83% — на вторую главную компоненту. Наибольший вклад в межвидовую изменчивость показателей красной крови по PC1 вносят эритроциты (13.66%), средний объем эритроцита (13.22%), тромбоциты (13.42%), тром-

Таблица 1. Лейкоцитарный состав периферической крови летучих мышей

Показатели	I. <i>M. dasycneme</i>	II. <i>V. murinus</i>	III. <i>P. nathusii</i>
	$\bar{X}_{boot} \pm SE_{boot} [95\% CI_{boot}]$		
Нейтрофилы, %	39.78 ± 1.42 [37.00–42.50]	54.02 ± 3.30* [47.20–60.20]	66.00 ± 0.47** [65.00–67.00]
• юные, %	2.49 ± 1.14 [0.50–4.75]	8.01 ± 1.29* [5.20–10.40]	7.52 ± 2.10 [3.00–12.00]
• палочкоядерные, %	25.99 ± 3.19 [18.75–30.00]	24.63 ± 3.02 [18.80–30.60]	38.00 ± 1.88** [34.00–42.00]
• сегментоядерные, %	11.19 ± 2.89 [6.00–16.75]	21.37 ± 2.46* [17.60–27.00]	20.50 ± 0.24* [20.00–21.00]
Лимфоциты, %	56.02 ± 1.83 [6.00–16.75]	43.41 ± 3.05* [37.60–49.20]	32.00 ± 0.01** [31.05–32.08]
Моноциты, %	2.50 ± 0.76 [0.75–3.75]	1.59 ± 0.78 [0.40–3.40]	1.00 ± 0.00 [1.00–1.01]
Эозинофилы, %	1.25 ± 0.42 [0.50–2.00]	1.00 ± 0.28 [0.40–1.60]	1.00 ± 0.47 [0.10–2.00]
Гранулоциты, %	41.01 ± 1.80 [37.50–44.50]	54.90 ± 3.40* [48.00–61.40]	67.01 ± 0.90*▲ [65.12–69.03]
Агранулоциты, %	58.50 ± 2.10 [54.50–62.50]	44.90 ± 3.50* [38.60–52.01]	33.01 ± 0.01*▲ [32.09–33.01]
ИСЛ, отн. ед.	0.8	1.2	2.0

Примечание: * – статистически значимые различия: I и II, I и III ($p < 0.05$); – статистически значимые различия: II и III ($p < 0.05$); $\bar{X}_{boot} \pm SE_{boot}$ – среднее арифметическое и ошибка среднего бутстреп-распределения; $[95\% CI_{boot}]$ – доверительный интервал бутстреп-распределения.

бокрит (13.07%), среднее содержание гемоглобина (12.27%).

Определены и их значимые коэффициенты корреляции с PC1: –0.95, 0.94, –0.94, –0.93, 0.90 – соответственно ($p = 0.001$). Значения первой главной компоненты отчетливо отделяют прудовую ночницу от обоих перелетных видов. PC2 сильно коррелирует (–0.67) с гематокритным показателем (вклад 36.86%), и в меньшей степени – с гемоглобином (вклад 18.01%), что также по данным показателям подтверждает неоднородность особей исследованных экологически контрастных видов.

У активно мигрирующих видов отмечено двукратное повышение количества тромбоцитов: у лесного нетопыря (PLT = 446.7 Г/л) и у двухцветного кожана (PLT = 476.3 Г/л) по сравнению с прудовыми ночницами (PLT = 213.1 Г/л), что указывает на возросшую долю объема цельной крови, занимаемой тромбоцитами, участвующими в качестве эффекторов иммунной системы. Тромбоциты, представляя ведущую роль в системе гомеостаза, участвуют в иммунных и аллергических реакциях организма наряду с макрофагами, нейтрофилам и эозинофилами [19]. При повреждении кровеносных сосудов тромбоциты первыми оказываются в зоне поражения, выступая как факторы врожденного иммунитета. Лейкоцитарный состав крови мигрирующих видов рукокрылых представлен двумя группами клеток: гранулоцитами (нейтрофилы:

юные, палочкоядерные, сегментоядерные, эозинофилы), определяющими реакции врожденного иммунитета, и агранулоцитами (моноциты, лимфоциты), ответственными за реакции адаптивного иммунного ответа (табл. 1).

Показателен повышенный уровень нейтрофилов у перелетных рукокрылых (см. табл. 1), что может быть связано с неспецифической защитой их организма от токсических воздействий, вирусных и бактериальных инфекций. Лейкоцитарный состав крови характеризуется значимо повышенным содержанием гетерофилов за счет увеличения числа зрелых сегментоядерных форм у двухцветного кожана ($p < 0.05$) и лесного нетопыря ($p < 0.05$), что обеспечивает подавление воспалительных реакций и активную неспецифическую защиту организма от патогенов (см. табл. 1).

Идентичность адаптивных механизмов исследуемых мигрирующих видов подтверждается отсутствием значимых различий в лейкограммах по содержанию факторов клеточных воспалительных реакций: эозинофильных лейкоцитов ($p = 0.99$) и моноцитов ($p = 0.99$), продуцирующих провоспалительные цитокины, – эндогенных регуляторов гемопоза и клеточно-опосредованного иммунного ответа [20].

Цитокины имеют широкий спектр функций, включая регулирование врожденного и адаптив-

ного иммунитета, активацию воспалительных реакций и стимуляцию кроветворения [20]. Лимфоцитарно-гранулоцитарный состав периферической крови характеризуется высокой долей гранулоцитов у мигрирующих двухцветного кожана (55%) и лесного нетопыря (67%), формирующих срочную защиту организма как от инфекций, так и от токсических воздействий и обеспечивающих их выживание за пределами нативного ареала (см. табл. 1). Высокие показатели интегрального лейкоцитарного индекса ИСЛ = 1.2 для двухцветного кожана и ИСЛ = 2.0 для лесного нетопыря по сравнению с ИСЛ = 0.8 прудовой ночницы подтверждают выраженную реактивность системы естественного врожденного иммунитета, способствующего формированию адаптивных реакций, обеспечивающих эврибионтность *V. murinus* и *P. nathusii*, мигрирующих на дальние расстояния.

Результаты исследований функциональной активности системы крови показывают, что *V. murinus* и *P. nathusii* могут быть использованы для оценки их адаптационных возможностей, способствующих длительным сезонным миграциям, а также служить основой для мониторинга численности видов и популяций рукокрылых с целью сохранения биоразнообразия и рационального использования ресурсов животного мира.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Института экологии растений и животных УрО РАН в рамках государственного задания (№122021000091-2). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Отлов и содержание животных в лаборатории осуществляли с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, используемых для экспериментальных и научных целей [15]. Протокол с использованием экспериментальных животных был одобрен комиссией по биоэтике Института экологии растений и животных УрО РАН (протокол № 11 от 29.04.2022).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Большаков В.Н., Орлов О.Л., Снитко В.П.* Летучие мыши Урала. Екатеринбург: Академкнига, 2005.
2. *Снитко В.П., Снитко Л.В.* Рукокрылые (Chiroptera, Vespertilionidae) Южного Урала (Челябинская область) // Зоологический журнал. 2017. Т. 96. № 3. С. 320–349.
3. *Снитко В.П.* Рукокрылые (Chiroptera) Ильменского заповедника // Plecotus et al. 2001. № 4. С. 69–74.
4. *Alcalde J., Jiménez M., Brila I., et al.* Transcontinental 2200 km migration of a Nathusius' pipistrelle (*Pipistrellus nathusii*) across Europe // Mammalia. 2021. V. 85 (2). P. 161–163.
5. *Vasenkov D., Desmet J.F., Popov I., et al.* Bats can migrate farther than it was previously known: a new longest migration record by Nathusius pipistrelle *Pipistrellus nathusii* (Chiroptera: Vespertilionidae) // Mammalia. 2022. V. 86 (5). P. 524–526.
6. *Rebelo H., Tarroso P., Jones G.* Predicted impact of climate change on European bats in relation to their biogeographic patterns // Global Change Biology. 2010. V. 16 (2). P. 561–576.
7. *Frik W.F., Kingston T., Flanders J.* A review of the major threats and challenges to global bat conservation // Annals of the New York Academy of Sciences. 2020. V. 1469 (1). P. 5–25.
8. *Rydell J., Bach L., Dubourg-Savage M.J., et al.* Bat mortality at wind turbines in Northwestern Europe // Acta Chiropterologica. 2010. V. 12 (2). P. 261–274.
9. *Russo D., Ancillotto L.* Sensitivity of bats to urbanization: a review // Mammalian Biology. 2015. V. 80 (3). P. 205–212.
10. *Frick W.F., Reynolds D.S., Kunz T.H.* Influence of climate and reproductive timing on demography of little brown myotis *Myotis lucifugus* // Journal of Animal Ecology. 2010. V. 79 (1). P. 128–136.
11. *Amorim F., Mata V.A., Beja P., et al.* Effects of a drought episode on the reproductive success of European free-tailed bats (*Tadarida teniotis*) // Mammalian Biology. 2015. V. 80. P. 228–236.
12. *Russo D., Salinas-Ramos V.B., Cistrone L., et al.* Do we need to use bats as bioindicators? // Biology. 2021. V. 10 (8). P. 693–708.
13. *Ковальчук Л.А., Мищенко В.А., Черная Л.В. и др.* Сезонная изменчивость иммуногематологических параметров периферической крови прудовой ночницы *Myotis dasycneme* (Voie, 1825), обитающей на Урале // Доклады РАН. Науки о жизни. 2023. Т. 510 (1). С. 278–282.
14. *Стрелков П.П.* Оседлые и перелетные виды летучих мышей (Chiroptera) в Европейской части СССР. Сообщение 1 // Бюллетень МОИП. Отдел биологии. 1970. Т. 75 (2). С. 38–52.
15. *Yarri D.* The Ethics of Animal Experimentation. Oxford: Oxford UniverPress, 2005.
16. *Chessel D., Dufour A.B., Thioulouse J.* The ade 4 package-I: One-table methods // R News. 2004. V. 4. P. 5–10.
17. *Bandouchova H., Zukal J., Linhart P., et al.* Low seasonal variation in greater mouse-eared bat (*Myotis myotis*)

- otis*) blood parameters // PLoS One. 2020. V. 15 (7): e0234784.
18. Kovalchuk L., Mishchenko V., Chernaya L., et al. Haematological parameters of pond bats (*Myotis dasycneme* Boie, 1825 Chiroptera: Vespertilionidae) in the Ural Mountains // Zoology and Ecology. 2017. V. 27 (2). P. 168–175.
19. Jenne CN., Urrutia R., Kubes P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity // International Journal of Laboratory Hematology. 2013. V. 35 (3). P. 254–261.
20. Scapigliati G., Buonocore F., Mazzini M. Biological activity of cytokines: an evolutionary perspective // Current Pharmaceutical Design. 2006. V. 12. P. 3071–3081.

FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE BLOOD SYSTEM OF TWO MIGRATORY SPECIES OF THE URAL

L. A. Kovalchuk^{a, #}, V. A. Mishchenko^{a, b}, L. V. Chernaya^a, V. P. Snit'ko^c,
Academician of the RAS V. N. Bolshakov^a

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

^b Federal Research Institute of Viral Infections "Virom" of the Russian Consumer
Protection Agency, Yekaterinburg, Russian Federation

^c South Ural Federal Scientific Centre of Mineralogy and Environmental Geology, Ural Branch
of the Russian Academy of Sciences, Ilmen Reserve, Miass, Russian Federation

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

The presented data on the study of the functional activity of the blood system of migratory species of the fauna of the Urals: *Vespertilio murinus* [Linnaeus, 1758], and *Pipistrellus nathusii* Keyserling et [Blasius, 1839]. Multivariate nonparametric analysis of variance of red blood parameters ($p < 0.05$) of migrating bats and the sedentary pond bat showed significant species differences. In bats, a certain genetically determined multidirectionality in the mobilization of emergency regulation mechanisms of the lymphoid blood system of sedentary and migratory species has been noted.

Keywords: bats, migratory species, peripheral blood, granulocytes.

УДК 620.187.3, 576.08

ИДЕНТИФИКАЦИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРНЫХ ДЕТАЛЕЙ СИСТЕМ ОТРОСТКОВ АСТРОЦИТОВ В НЕРВНОЙ ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОРРЕЛЯТИВНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ И ПРОСВЕЧИВАЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2024 г. О. И. Агапова¹, А. Е. Ефимов¹, Е. А. Образцова^{2,3}, К. Е. Мочалов², Д. О. Соловьева², В. А. Олейников^{2,4}, И. И. Агапов^{1,*}, академик РАН С. В. Готье^{1,5}

Поступило 29.11.2023 г.

После доработки 27.12.2023 г.

Принято к публикации 28.12.2023 г.

Наноразмерные морфологические особенности разветвленных отростков глиальных клеток могут иметь определяющее значение для нейрон-астроцитарных взаимодействий в норме и в патологии. В работе представлены результаты корреляционного анализа изображений тонких отростков астроцитов в нервной ткани головного мозга мыши, полученных методами сканирующей зондовой микроскопии и просвечивающей электронной микроскопии с высоким пространственным разрешением. Образцы были приготовлены и визуализированы с помощью уникальной аппаратной комбинации методов ультрамикротомии и сканирующей зондовой микроскопии. Было показано, что на изображениях идентифицируются детали астроцитов толщиной порядка десятков нанометров, что может быть использовано в дальнейшем для восстановления трехмерной структуры астроцитарных отростков за счет интеграции серий последовательных изображений сверхтонких срезов нервной ткани.

Ключевые слова: сканирующая зондовая микроскопия, просвечивающая электронная микроскопия, астроциты, нервная ткань, ультрамикротомия.

DOI: 10.31857/S2686738924020146, **EDN:** WEXZZQ

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

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиком М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

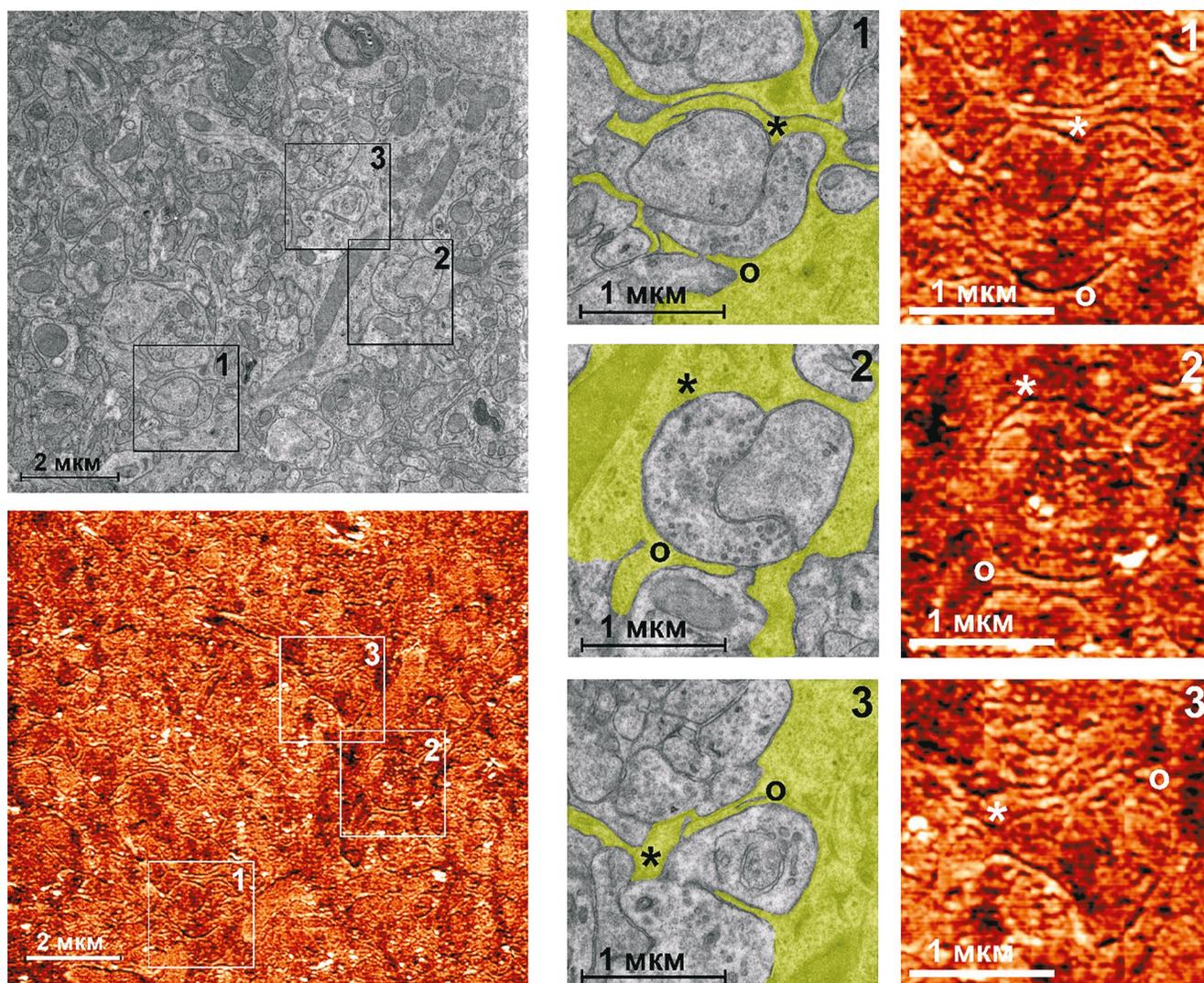
³Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)”, Долгопрудный, Россия

⁴Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия.

⁵Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова” Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), Москва, Россия

*E-mail: igor.agapov@gmail.com

Астроциты являются важнейшими компонентами нейронных цепей, наиболее распространенными глиальными клетками в центральной нервной системе и участвуют в синаптических, контурных и поведенческих функциях. Хорошо развитые протоплазматические астроциты содержат многочисленные отростки, имеющие сложную разветвленную форму. При нормальных физиологических процессах, таких как развитие и старение мозга, а также при патологических процессах, например эпилепсии, болезни Альцгеймера, наблюдаются значительные изменения в нейрон-астроцитарных взаимодействиях. В частности, данные изменения регулируются отростками астроцитов. Обнаружение и изучение патологий этих микроструктур стало возможно только благодаря инновационным подходам в микроскопии. Однако клеточные и молекулярные механизмы изменений в астроцитарных отростках малоизучены. Критически важным для понимания и дальнейшего исследования этих структур является возможность разрешить ультратонкие детали самих астроцитов и областей их контактов с другими структурами [1]. Мелкие астроцитарные отростки имеют наноразмеры, что



Комплементарные ПЭМ- и СЗМ-изображений участков астроцитов. Обзорные изображения (слева) и увеличенные участки (справа). На увеличенных изображениях тонкие отростки астроцитов на ПЭМ-изображениях отмечены цветом, символами указаны комплементарные области.

исключает использование световой микроскопии без дополнительного маркирования ткани флуоресцентными метками и обуславливает необходимость использования методов микроскопии высокого разрешения [2]. Современные подходы позволяют сочетать различные методы визуализации и манипулирования тканями для получения трехмерной картины таких сложных структур, как астроциты [3–5]. Однако данные различных взаимодополняющих методов получения изображений с большим пространственным разрешением требуют разработки не только процедур накопления данных, но и методик идентификации элементов на изображениях, алгоритмов восстановления трехмерных структур.

В данной работе мы представляем результаты проведения сравнительного анализа коррелятивных измерений систем отростков астроцитов

методами просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) с использованием ультрамикротомии (УМТ). В предыдущих работах нами была разработана уникальная научная установка (<http://skr-rf.ru/usu/486825/>), объединяющая в себе техники СЗМ и УМТ [6–8]. Эта разработка позволяет многократно производить сверхтонкие (до 20 нм) срезы с поверхности образца с последующим получением СЗМ-изображений, восстанавливая таким образом морфологию образца. Данная методика получила название "сканирующая зондовая нанотомография" (СЗНТ) и может быть использована для восстановления трехмерной ультраструктуры биологических объектов за счет интегрирования СЗМ-изображений поверхности образца после последовательных сверхтонких срезов. Данный метод представляется перспективным для исследования

тонкой структуры астроцитов, тем более что получение СЗМ-изображений может быть дополнено измерениями пространственного распределения флуоресцентно-меченых объектов и спектральной информации методом конфокальной микроспектроскопии на тех же участках [7]. Для корректной интерпретации изображений, полученных с помощью СЗМ, и однозначного определения элементов астроцитов в случае исследования тканей мозга требовалось проведение предварительных корреляционных измерений с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

Для измерений использована ткань мозга “тено-типически здоровых” мышей линии 5xFAD. Ткань мозга мышей была фиксирована путем транскардиальной перфузии растворами альдегидов, извлечена и дополнительно фиксирована 1%-ным раствором тетраоксида осмия. Затем – обезвожена и заключена в акрилатную среду.

При помощи ультрамикротомы, входящего в состав установки СЗНТ с алмазным ножом Diatome Ultra AFM 35 (Diatome AG, Швейцария), были получены сверхтонкие срезы образцов тканей толщиной 70 нм. Применяемые алмазные ножи позволяют получить не только малую толщину среза, но и достаточно гладкую поверхность, что критически важно для проведения измерений методом СЗМ.

Несколько последних срезов были перенесены на стандартные медные бленды для электронной микроскопии с покрытием из формвара. После чего образцы были контрастированы с использованием насыщенных водных растворов уранилацетата и цитрата свинца согласно [9].

ПЭМ-изображения срезов нервной ткани были получены в режиме СПЭМ (сканирующей электронной микроскопии в просвечивающем режиме) с использованием микроскопа Zeiss Merlin (Zeiss, Германия). Для получения достаточного контраста изображений были использованы ускоряющие напряжения 20–24 кВ, ток зонда 150–180 пА. Такие параметры измерений позволили получать изображения как в просвечивающем режиме, так и в режиме обратно отраженных электронов.

Поверхность блока залитого образца нервной ткани непосредственно после выполнения срезов была проанализирована при помощи СЗМ, входящего в состав установки СЗНТ. Для ориентации на поверхности образца были использованы обзорные изображения с малым увеличением, на которых можно было найти реперные особенности, например крупные образования характерной формы. Такие реперные особенности были использованы для согласования масштаба и угла поворота изображений СЗМ и СПЭМ.

Поскольку при использовании СЗМ разрешение изображений ограничено количеством точек, в которых проводятся измерения, для выделения тонких астроцитарных структур были получены СЗМ-изображения меньшего размера с существенно более высоким латеральным разрешением. На рисунке приведены комплементарные ПЭМ- и СЗМ-изображения участков астроцитов. На ПЭМ-изображениях желтыми контурами отмечены участки, которые мы идентифицируем как астроциты. Соответствующие структуры на СЗМ-изображениях отмечены стрелками. Видно, что применение электронной микроскопии позволяет получить изображения более высокого качества. Однако СЗМ-изображения имеют достаточную детализацию для определения характерных деталей нервной ткани. Анализ приведенных данных позволяет заключить, что наиболее уверенно на СЗМ-изображениях можно регистрировать тонкие отростки астроцитов (веточки, листочки) толщиной 50–100 нм в окрестностях синапсов и щелевых контактов, которые выглядят как окружающие их удлинённые двух- или трехслойные структуры. Изучение подобных астроцитарно-нейронных взаимодействий является важной задачей, поскольку подвергается изменениям при ряде патологий. Приведенные изображения были получены для выполненного сверхтонкого среза при помощи ПЭМ и поверхности блока после среза при помощи СЗМ. Однако, несмотря на максимально приближенные к комплементарности объекты, коррелятивная морфология наблюдаемых структур не полностью совпадает, что говорит о том, что морфология астроцитарных участков может заметно изменяться на масштабе нескольких толщин среза, которая составляет всего несколько десятков нанометров.

Таким образом, на основании коррелятивных измерений методами СЗМ и ПЭМ в работе показано, что сканирующая зондовая микроскопия может применяться для эффективной визуализации тканей головного мозга и исследования особенностей строения астроцитов с пространственным разрешением на нанометровом уровне. При этом методически можно рекомендовать выполнение измерений с разрешением не более 2 нм/рх. При анализе изображений в первую очередь необходимо регистрировать удлинённые двух- или трехслойные структуры толщиной от 50 до 100 нм, располагающиеся вокруг синапсных структур размерами около 1 мкм. Данные удлинённые структуры с высокой вероятностью являются тонкими астроцитарными отростками, которые можно сегментировать для последующей трехмерной реконструкции. Использование СЗНТ для последовательного удаления тонких слоев с поверхности блока и получения СЗМ-изображений тканей головного мозга даст

возможность восстановить трехмерную картину распределений астроцитарных участков.

При этом важно отметить, что использование СЗМ для анализа поверхности блоков не требует контрастирования с применением соединений тяжелых металлов. Это может играть важную роль для минимизации нарушений клеточных структур, вызываемых фиксацией и контрастированием. Кроме того, соединения тяжелых металлов, используемые для контрастирования в электронной микроскопии, в большинстве случаев значительно снижают эффективность использования флуоресцентных маркеров. Таким образом, использование СЗМ как метода исследований трехмерной ультраструктуры нервной ткани также расширяет возможности применения и коррелятивных методик флуоресцентной микроскопии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Сутягину О. И. за помощь в подготовке биологических образцов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-00168) в части получения образцов и выполнения ПЭМ-исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней, а также в соответствии с Директивой 2010/63/EU об использовании животных для экспериментальных исследований и с этическими регламентами ИБХ РАН по содержанию и использованию животных, учитывающими этические и юридические нормы Rus-LASA и международные GLP-стандарты. Настоящее исследование

одобрено комиссией ИБХ РАН по контролю за содержанием и использованием животных, протокол № 337/2021 от 15.11.2021 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zuo Y.-X., Jiang R. T., Zhou B. Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases // *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2019. V. 25. P. 661–807.
2. Kiyoshi C.M., Aten S., Arzola E.P., et al. Ultrastructural view of astrocyte-astrocyte and astrocytesynapse contacts within the hippocampus // *bioRxiv*. 2020.
3. Morita M. Modern Microscopic Approaches to Astrocytes // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 5883.
4. Curry N., Ghézali G., Kaminski Schierle G.S., et al. Correlative STED and Atomic Force Microscopy on Live Astrocytes Reveals Plasticity of Cytoskeletal Structure and Membrane Physical Properties during Polarized Migration // *Front. Cell. Neurosci.* 2017. V. 11. P. 104.
5. Kikuchi T., Gonzalez-Soriano J., Kastanauskaite A., et al. Volume Electron Microscopy Study of the Relationship Between Synapses and Astrocytes in the Developing Rat Somatosensory Cortex // *Cerebral Cortex*. 2020. V. 30. P. 3800–3819.
6. Efimov A.E., Agapov I.I., Agapova O.I., et al. A novel design of a scanning probe microscope integrated with an ultramicrotome for serial block-face nanotomography // *Review of Scientific Instruments*. 2017. V. 88. P. 023701.
7. Агапова О.И., Ефимов А.Е., Сафонова Л.А. и др. Сканирующая оптическое-зондовая нанотомография для исследования структуры биоматериалов и клеток // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2021. Т. 500. № 1. С. 483–487.
8. Mochalov K.E., Chistyakov A.A., Solovyeva D.O., et al. An instrumental approach to combining confocal microspectroscopy and 3D scanning probe nanotomography // *Ultramicroscopy*. 2017. V. 182. P. 118–123.
9. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине / А.А. Миронов, Я.Ю. Комиссарчик, В.А. Миронов; отв. ред. Н.Н. Никольский. – СПб.: Наука, 1994.
10. Hanaichi T., Sato T., Iwamoto T., et al. A Stable Lead by Modification of Sato's Method // *Journal of Electron Microscopy*. 1986. V. 35. P. 304–306.

IDENTIFICATION OF ULTRASTRUCTURAL DETAILS OF THE ASTROCYTE PROCESS SYSTEM IN NEURAL TISSUE OF THE BRAIN USING CORRELATIVE SCANNING PROBE AND TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY

**O. I. Agapova^a, A. E. Efimov^a, E. A. Obraztsova^{b, c}, K. E. Mochalov^b, D. O. Solovyeva^b,
V. A. Oleinikov^{b, d}, I. I. Agapov^{a, #}, Academician of the RAS S. V. Gautier^{a, e}**

^a*Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation*

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

^c*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russian Federation*

^d*National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russian Federation*

^e*Sechenov University, Moscow, Russian Federation*

[#]*E-mail: igor.agapov@gmail.com*

Nanoscale morphological features of branched processes of glial cells may be of decisive importance for neuron-astrocytic interactions in health and disease. The paper presents the results of a correlation analysis of images of thin processes of astrocytes in the nervous tissue of the mouse brain, obtained by scanning probe microscopy and transmission electron microscopy with high spatial resolution. Samples were prepared and imaged using a unique hardware combination of ultramicrotomy and scanning probe microscopy. It was shown that the images identified details of astrocytes with a thickness of the order of tens of nanometers, which can be used in the future to reconstruct the three-dimensional structure of astrocytic processes by integrating a series of sequential images of ultrathin sections of nervous tissue.

Keywords: scanning probe microscopy, transmission electron microscopy, astrocytes, neural tissue, ultramicrotomy.

УДК 581.1

ОБРАБОТКА СЕМЯН САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ УСИЛИВАЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ДЕФИЦИТЕ ЦИНКА ИЛИ МЕДИ

© 2024 г. Н. М. Казнина*, Н. С. Репкина, Ю. В. Батова, А. А. Игнатенко, член-корреспондент РАН А. Ф. Титов

Поступило 15.12.2023 г.

После доработки 30.12.2023 г.

Принято к публикации 02.01.2024 г.

Изучали влияние обработки салициловой кислотой (СК) семян пшеницы на уровень экспрессии генов *TaCu/ZnSOD*, *TaFeSOD* и *TaCAT2* и активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ)) в листьях при оптимальном содержании цинка (2 мкМ) и меди (0.3 мкМ) в корнеобитаемой среде или их недостатке. Впервые показано, что обработка СК семян приводит к повышению по сравнению с необработанными растениями количества транскриптов изученных генов, причем как в оптимальных условиях минерального питания, так и при дефиците цинка или меди. При этом также возрастает активность ферментов, особенно каталазы. Судя по содержанию МДА, это позволяет избежать усиления интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) и, соответственно, развития окислительного стресса. Сделан вывод, что обнаруженный положительный эффект обработки семян СК на активность основных ферментов антиоксидантной защиты может лежать в основе стимулирующего действия данного фитогормона на физиологические процессы у растений, испытывающих дефицит микроэлементов.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., фитогормоны, цинк, медь, супероксиддисмутаза, каталаза, экспрессия генов, активность ферментов.

DOI: 10.31857/S2686738924020154, EDN: WEMONE

Микроэлементы, несмотря на их очень небольшое содержание в растительных клетках, крайне необходимы для нормальной жизнедеятельности растений и успешного протекания физиолого-биохимических процессов. Цинк и медь являются одними из наиболее важных среди них. Так, цинк входит в состав или служит кофактором более 300 ферментов, таких как Cu/Zn-супероксиддисмутаза, карбоангидраза, алкогольдегидрогеназа, РНК-полимераза; участвует в белок-белковом взаимодействии; является необходимым элементом домена «цинковый палец», входящего в состав многих факторов транскрипции, необходим для синтеза ауксина [1, 2]. Важная роль меди в жизнедеятельности растений обусловлена ее участием в окислительно-восстановительных реакциях клетки, в том числе в

нейтрализации активных форм кислорода [3]. Кроме того, выявлено ее участие в работе более чем 100 ферментов, включая Cu/Zn-супероксиддисмутаза, оксидоредуктазу, цитохром- и полифенолоксидазу, в транспорте белков, метаболизме клеточной стенки, переносе электронов в дыхательной и фотосинтетической электрон-транспортных цепях и передаче гормонального сигнала [4, 5]. Важную роль этот микроэлемент играет также в углеводном и белковом обмене, энергетическом и азотном метаболизме [6].

Вследствие большого числа функций, которые цинк и медь выполняют в растениях, их дефицит вызывает многочисленные негативные изменения в физиологических процессах, среди которых — нарушение проницаемости клеточных мембран, транспорта воды и элементов минерального питания, замедление фотосинтеза и дыхания, торможение деления и растяжения клеток и др. [5, 7].

Известно, что с целью увеличения стрессоустойчивости растений и повышения их продуктивности

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

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

в неблагоприятных условиях внешней среды используют обработку растений или семян различными регуляторами роста, в том числе фитогормонами. Салициловая кислота (СК, 2-гидроксibenзойная кислота) – фенольное соединение, сочетающее в себе свойства фитогормона и сигнальной молекулы [8]. Подобно другим фитогормонам, она регулирует многие физиологические процессы, такие, например, как рост, развитие, цветение, закрытие устьиц, фотосинтез, транспирация, транспорт ионов и др. [9]. Как сигнальная молекула СК индуцирует активность антиоксидантных ферментов, участвует в путях передачи сигналов, регулирующих физиологические процессы [10]. Кроме того, обнаружена важная роль СК в адаптации растений к ряду абиотических стресс-факторов, включая засоление, низкие и высокие температуры, высокие концентрации тяжелых металлов, УФ-излучение [11, 12]. Что касается возможности использования СК в качестве адаптогена для повышения устойчивости растений к дефициту микроэлементов, то таких данных практически нет.

Вместе с тем ранее нами было обнаружено, что у растений ячменя и пшеницы после обработки их семян СК в условиях недостатка цинка или меди в субстрате сохраняется высокий уровень фотосинтеза и водного обмена, что положительно сказывалось на накоплении ими биомассы [13]. Поскольку устойчивость растений к стресс-факторам во многом зависит от способности клеток поддерживать на определенном уровне окислительно-восстановительный баланс, можно предположить участие СК в регуляции работы компонентов антиоксидантной системы, обеспечивающих защиту клеток растений от окислительного стресса и при дефиците микроэлементов.

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы было изучение влияния обработки СК семян пшеницы на экспрессию генов и активность ключевых антиоксидантных ферментов в листьях растений, испытывающих дефицит цинка или меди.

Исследования проводили на растениях пшеницы (*Triticum aestivum L.*) сорта Злата. Семена были предоставлены ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр “Немчиновка”. Часть семян проращивали в течение 3 сут на дистиллированной воде (вариант СК0), другую часть – в течение первых суток выдерживали на растворе СК (10 мкМ), затем отмывали и продолжали проращивать на дистиллированной воде (вариант СК). Концентрация СК и продолжительность обработки были выбраны на основании предварительных опытов. Спустя 3 сут проростки обоих вариантов высаживали в контейнеры (объемом 0.86 л) с предварительно отмытым от примесей и прокаленным песком. Полив растений осуществляли питательным раствором Хогланда – Арнона с оптимальным содержанием цинка (2 мкМ) и меди (0.3 мкМ) (вариант Zn⁺, Cu⁺), недостатком цинка (вариант Zn⁻) или недостатком меди (вариант Cu⁻). Растения выращивали в камере искусственного климата при температуре 22 °С, относительной влажности воздуха 60–70%, ФАР 180 мкмоль/(м²·с) и 14-часовом фотопериоде в течение 30 сут. После чего в их листьях определяли количество транскриптов генов *TaCu/ZnSOD2*, *TaFeSOD* и *TaCAT*, общую активность супероксиддисмутазы (СОД) и активность каталазы (КАТ), а также интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Накопление транскриптов генов анализировали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на амплификаторе CFX96 Real-Time System (“Био-Рад”, США). Листья растирали в жидком азоте. Тотальную РНК выделяли с помощью набора ExtractRNA “Евроген” (Россия). Количество и качество тотальной РНК проверяли спектрофотометрически с использованием прибора NanoPhotometer IMPLEN (Германия) по соотношению длин волн 260/280 и с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Для удаления остатков ДНК препарат РНК обрабатывали ДНКазой “Евроген” (Россия), кДНК синтезировали, используя набор для обратной транскрипции

Таблица 1. Праймеры для проведения ПЦР-РВ

Ген	Прямой (F) и обратный (R) праймер	Нуклеотидная последовательность праймера 5'...3'	Номер в базе данных NCBI
<i>Actin</i>	F R	GGG ACC TCACGGATAATCTAATG AACCTCCACTGAGAACAACATTAC	AB181991
<i>Cu/ZnSOD2</i>	F R	CACGGCTTCCACATCCAC TGTCGTTTCATCATCCATCGG	KP322572
<i>FeSOD</i>	F R	GGGTCTGGTTGGGTTTG TCGCCTGTATCCTTGTAATC	JX398977
<i>CAT</i>	F R	TGATACCCAAAGGCACCG GCAGCCAGATAGAACACC	X94352

с M-MLV обратной транскриптазой и случайными (random) гексапраймерами “Евроген” (Россия). В качестве референсного гена использовали актин. Количество и качество синтезированной кДНК проверяли спектрофотометрически на приборе NanoPhotometer IMPLEN (Германия). Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР фрагментов. Эффективность ПЦР, оцениваемая по стандартной кривой, достигала 98%. Содержание транскриптов гена вычисляли по формуле $2^{-\Delta\Delta Ct}$ и выражали в относительных единицах [14]. Праймеры, использованные для проведения ПЦР в режиме реального времени, представлены ниже (табл. 1).

Для определения активности СОД (КФ 1.15.1.1.) и КАТ (КФ 1.11.1.6.) листья гомогенизировали в 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.8). Гомогенат центрифугировали при 14 000 g в течение 20 мин при 4°C, полученный супернатант использовали для определения содержания белка и активности ферментов спектрофотометрическим методом. Активность СОД определяли по способности ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия. Оптическую плотность раствора измеряли при 560 нм. За единицу активности принимали количество фермента, вызывающее 50%-ное ингибирование реакции. Для определения активности каталазы использовали спектрофотометрический метод. Скорость разложения H_2O_2 определяли, регистрируя изменение оптической плотности

раствора при длине волны 240 нм в течение 1 мин. Реакционная среда содержала 40 мМ раствор H_2O_2 в 0.1М К/Na- фосфатном буфере (pH 7.0). Реакцию запускали добавлением 60 мкл супернатанта. Активность ферментов рассчитывали на 1 мг белка. Общее содержание белка определяли по методу Бредфорда, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Об интенсивности ПОЛ судили по содержанию малонового диальдегида (МДА), которое определяли с использованием реакционной среды, содержащей 0.25%-ный раствор тиобарбитуровой кислоты в 10%-ной трихлоруксусной кислоте на спектрофотометре СФ-2000 («Спектр», Россия) при 532 и 600 нм. Для расчета содержания МДА использовали коэффициент экстинкции, равный $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Биологическая повторность составляла 3–5 растений в зависимости от показателя, аналитическая повторность – 3-кратная. Весь опыт повторяли дважды. На рисунках и в таблицах приведены средние значения и их стандартные ошибки. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программ Microsoft Excel 2007 и PAST 4.0. Статистически значимо различающиеся величины каждого изученного показателя (при $p < 0.05$) обозначены разными латинскими буквами.

В ходе исследований установлено, что у растений пшеницы, чьи семена не были обработаны СК (вариант СК0), недостаток цинка (Zn-) и меди

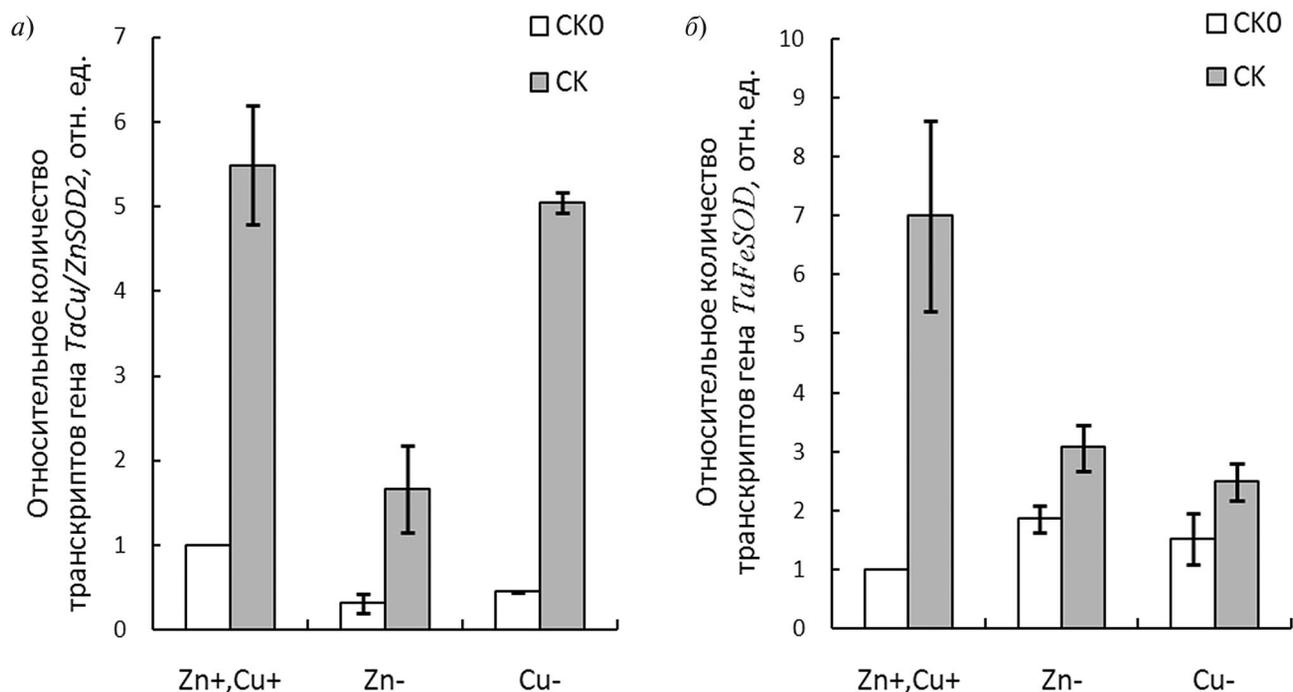


Рис. 1. Влияние предобработки семян СК на относительное количество транскриптов генов *TaCu/ZnSOD2* и *TaFeSOD* в листьях пшеницы при недостатке цинка или меди в субстрате.

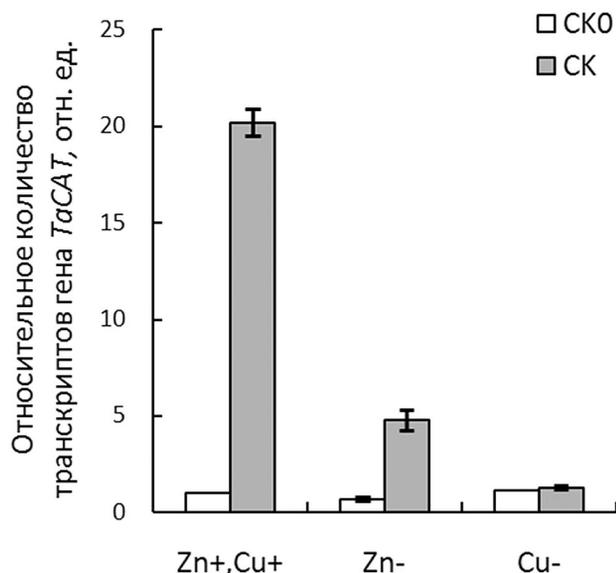


Рис. 2. Влияние предобработки семян СК на относительное количество транскриптов гена *TaCAT* в листьях пшеницы при недостатке цинка или меди в субстрате.

Таблица 2. Влияние предобработки семян СК на общую активность СОД, активность КАТ и содержание МДА в листьях пшеницы при недостатке цинка или меди в субстрате

Вариант	Общая активность СОД, усл. ед. активности/мг белка	Активность КАТ, мкмоль Н ₂ О ₂ /мг белка·мин	Содержание МДА, мкмоль/г сырого веса
Без обработки СК			
Zn+, Cu+	3.93 ± 0.26a	6.07 ± 0.68ab	12.81 ± 0.36ab
Zn-	3.56 ± 0.16a	4.97 ± 0.23c	11.80 ± 0.34b
Cu-	2.58 ± 0.30b	4.64 ± 0.11c	12.26 ± 1.20ab
Обработка семян СК			
Zn+, Cu+	4.26 ± 0.26a	6.11 ± 0.29b	15.80 ± 1.37a
Zn-	4.13 ± 0.22a	8.09 ± 0.51a	12.02 ± 0.50b
Cu-	3.29 ± 0.25a	7.81 ± 0.47a	16.88 ± 0.49a

(Cu-) в корнеобитаемой среде вызывал заметное снижение количества транскриптов гена *TaCu/ZnSOD2* в 4 и 2 раза, соответственно, по сравнению с их оптимальным содержанием (рис. 1а), при этом уровень мРНК гена *TaFeSOD*, наоборот, возрастал почти в 2 раза (рис. 1б).

Предобработка семян СК (вариант СК) приводила к заметному усилению по сравнению с не-

обработанными растениями (СК0) экспрессии генов обеих изоформ СОД (рис. 1а и б), что более отчетливо проявилось при оптимальном содержании микроэлементов. Отметим также, что при недостатке цинка и меди обработка СК в большей степени влияла на количество транскриптов гена *TaCu/ZnSOD2*, которое возрастало (по сравнению с необработанными растениями) в 6 и 10 раз, соответственно (рис. 1а), тогда как количество мРНК гена *TaFeSOD* повышалось лишь в 1.6 и 1.4 раза, соответственно (рис. 1б).

В литературе имеются противоречивые сведения об изменении уровня экспрессии генов, кодирующих Cu/Zn-содержащую изоформу СОД, у растений при недостатке цинка и меди. Так, у сои при дефиците цинка [7] и у арабидопсиса при дефиците меди [15] наблюдалось снижение уровня экспрессии генов, кодирующих *Cu/ZnSOD*. В отличие от этого, у сорго [16] и у Zn-эффективного сорта пшеницы [17] при дефиците цинка, а также в работе других авторов у арабидопсиса при дефиците меди [3] отмечено увеличение накопления мРНК генов этой изоформы СОД. Что касается генов *FeSOD*, то в большинстве случаев их экспрессия в условиях недостатка цинка или меди в корнеобитаемой среде усиливается, что, как полагают, является компенсаторной реакцией в ситуации с уменьшением экспрессии генов *Cu/ZnSOD*. Подобный эффект был, к примеру, отмечен в листьях кукурузы при дефиците цинка [18] и у арабидопсиса при дефиците меди [15].

О влиянии предобработки семян СК на экспрессию генов, кодирующих синтез разных изоформ СОД, в условиях недостатка микроэлементов в корнеобитаемой среде данных нет. Результаты нашего исследования показали, что обработка семян СК способствовала увеличению в листьях пшеницы экспрессии генов синтеза и Cu/Zn-содержащей (*TaCu/ZnSOD2*), и железосодержащей (*TaFeSOD*) изоформ СОД, причем не только в оптимальных условиях минерального питания, но и при дефиците цинка или меди в корнеобитаемой среде (рис. 1а и б).

Наряду с СОД важную роль в поддержании окислительно-восстановительного баланса клетки играет каталаза – один из наиболее эффективных антиоксидантных ферментов, нейтрализующих пероксид водорода. В отношении ее участия в антиоксидантном ответе клетки на низкий уровень микроэлементов сведений крайне мало. Хотя показано, что при низком содержании цинка в листьях ячменя [19] уровень экспрессии гена *Cat* был более высоким, чем при его оптимальном содержании. Нами же было обнаружено, что у пшеницы в варианте без обработки СК количество транскриптов гена *TaCAT* в листьях было относительно невысо-

ким и при дефиците цинка или меди практически не менялось (рис. 2). В отличие от этого после обработки семян СК уровень экспрессии этого гена резко возрастал как при оптимальном содержании цинка и меди (почти в 20 раз по сравнению с вариантом СК0), так и при недостатке цинка (в 5 раз) в корнеобитаемой среде. Но при недостатке меди подобный эффект отсутствовал.

Важно, что активность изученных ферментов (СОД и КАТ) в определенной степени коррелировала с уровнем экспрессии генов, контролируемых их синтез (табл. 2). Так, у проростков, чьи семена были обработаны СК, при оптимальном содержании цинка и меди, а также при их дефиците общая активность СОД была несколько выше, чем у не обработанных СК растений, хотя статистически значимые различия между вариантами опыта наблюдались только при дефиците меди. Активность КАТ в варианте опыта с обработкой СК оказалась заметно выше, чем в варианте без обработки СК при дефиците обоих микроэлементов.

Полагают, что при дефиците цинка и меди основной причиной развития окислительного стресса является уменьшение активности *Cu/ZnSOD*, что было, например, выявлено у пшеницы [17] и кукурузы [18]. Однако повышение активности других изоформ фермента, в частности, *FeSOD*, обеспечивает нейтрализацию супероксид-радикала в клетках в условиях стресса, связанного с дефицитом микроэлементов. Накопление при этом избыточных количеств пероксида приводит через механизм обратной связи к увеличению активности ферментов, участвующих в ее нейтрализации. Так, повышение активности КАТ при недостатке микроэлементов ранее было отмечено у риса [20] и кукурузы [18]. В наших исследованиях у растений без обработки семян СК общая активность СОД уменьшалась только при дефиците меди, а активность КАТ при дефиците обоих микроэлементов. Предобработка семян СК способствовала повышению активности изученных антиоксидантных ферментов, что отчасти могло быть связано с более высоким содержанием цинка и меди в листьях. Это позволило в условиях их дефицита не допустить повышения интенсивности ПОЛ, о чем свидетельствует отсутствие увеличения содержания МДА (по сравнению с оптимальным уровнем микроэлементов) в этих условиях (табл. 2).

Таким образом, нами впервые обнаружено, что после обработки семян пшеницы СК у проростков в условиях дефицита цинка и меди возрастает (по сравнению с необработанными растениями) экспрессия генов, ответственных за синтез двух изоформ СОД – *Cu/ZnSOD* и *FeSOD*, и гена, контролирующего синтез КАТ, и увеличивается активность этих ферментов, что способствует поддержанию

на необходимом уровне окислительно-восстановительного баланса клеток. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что положительный эффект обработки семян СК на активность основных ферментов антиоксидантной защиты может отчасти объяснить механизм ее положительного воздействия на физиологические процессы у растений, испытывающих дефицит цинка или меди. Это также служит дополнительным аргументом в пользу высказанного нами ранее предположения о том, что защитный эффект СК на растения носит достаточно пролонгированный характер, поэтому обработка СК семян способна при дальнейшем росте проростков приводить к увеличению их стрессоустойчивости [12]. Учитывая доступность и невысокую цену СК, обработка ею семян злаков может быть экономически выгодным, безопасным и эффективным способом повышения устойчивости растений к дефициту цинка и меди и повышения их продуктивности на почвах с низким содержанием этих микроэлементов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда №22-26-00168 (<https://rscf.ru/project/22-26-00168/>) на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Al Jabri H., Saleem M.H., Rizwa M., et al.* Zinc oxide nanoparticles and their biosynthesis: Overview // *Life*. 2022. V. 12: 594.
2. *Zaheer I.E., Ali S., Saleem M.H., et al.* Combined application of zinc and iron-lysine and its effects on morphophysiological traits, antioxidant capacity and chromium uptake in rapeseed (*Brassica napus L.*) // *PloS One*. 2022. V. 17: e0262140.
3. *Mermoud M., Takusagawa M., Kurata T., et al.* SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7 mediates copper deficiency response in the presence of high nitrogen in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Reports*. 2019. V. 38 (7). P. 835–846.
4. *Gong Q., Li Z.H., Wang L., et al.* Gibberellic acid application on biomass, oxidative stress response, and photosynthesis in spinach (*Spinacia oleracea L.*) seedlings un-

- der copper stress // Environ. Sci. Pollut. Res. 2021. V. 28. P. 53594–53604.
5. Chen H.-H., Chen X.-F., Zheng Z.-C., et al. Characterization of copper-induced-release of exudates by *Citrus sinensis* roots and their possible roles in copper-tolerance // Chemosphere. 2022. V. 308 (2): 136348.
 6. Schulten A., Pietzenuk B., Quintana J., et al. Energy status-promoted growth and development of Arabidopsis require copper deficiency response transcriptional regulator SPL7 // Plant cell. 2022. V. 34. P. 3873–3898.
 7. Zeng H., Zhang X., Ding M., et al. Transcriptome profiles of soybean leaves and roots in response to zinc deficiency // Physiol. Plant. 2019. V. 167 (3). P. 330–351.
 8. Kumar D. Salicylic acid signaling in disease resistance // Plant Sci. 2014. V. 228. P. 127–134.
 9. Sharma A., Sidhu G.P., Arantiti F., et al. The role of salicylic acid in plants exposed to heavy metals // Molecules. 2020. V. 25 (3): 540.
 10. Mohsenzadeh S., Shahrtash M., Mohabatkar H. Interactive effects of salicylic acid and silicon on some physiological responses of cadmium-stressed maize seedlings // Iran J. Sci. Technol. 2011. V. 35. P. 57–60.
 11. Gondor O.K., Pál M., Janda T., et al. The role of methyl salicylate in plant growth under stress conditions // J. Plant Physiology. 2022. V. 277: 153809.
 12. Ignatenko A.A., Nilova I.A., Kholoptseva E.S., et al. Effect of seed treatment with salicylic acid on the carbonic anhydrase activity, photosynthesis rate, stomatal conductance, and pigments content in wheat leaves at zinc excess // Doklady Biological Sciences. 2023.
 13. Kaznina N., Repkina N., Ignatenko A., et al. Effect of salicylic acid on physiological parameters of wheat under zinc or copper deficiency // Vegetos. 2023. V. 36 (3).
 14. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method // Methods. 2001. V. 25. P. 402–408.
 15. Yamasaki H., Abdel-Ghany S.E., Cohu C.M., et al. Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis* // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 16369–16378.
 16. Li Y., Zhang Y., Shi D., et al. Spatial-temporal analysis of zinc homeostasis reveals the response mechanisms to acute zinc deficiency in *Sorghum bicolor* // New Phytol. 2013. V. 200. P. 1102–1115.
 17. Hacisalihoglu G., Hart J.J., Wang Y.-H., et al. Zinc efficiency is correlated with enhanced expression and activity of zinc-requiring enzymes in wheat // Plant Physiol. 2003. V. 131. P. 595–602.
 18. Tewari R.K., Kumar P., Sharma P.N. An effective antioxidant defense provides protection against zinc deficiency-induced oxidative stress in Zn-efficient maize plants // J. Plant Nutr. Soil Sci. 2019. V. 182. P. 701–707.
 19. Batova Yu., Kaznina N., Repkina N., et al. Effect of zinc deficiency and excess on catalase activity and *HvCAT2* gene expression in barley // Vegetos. 2022. V. 35. P. 833–838.
 20. Chen W., Yang X., He Z., et al. Differential changes in photosynthetic capacity, 77 K chlorophyll fluorescence and chloroplast ultrastructure between Zn-efficient and Zn-inefficient rice genotypes (*Oryza sativa*) under low zinc stress // Physiol. Plant. 2008. V. 132. P. 89–101.

SEEDS TREATMENT WITH SALICYLIC ACID INCREASES GENE EXPRESSION AND ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN WHEAT PLANTS UNDER ZINC OR COPPER DEFICIENCY

**N. M. Kaznina[#], N. S. Repkina, Yu. V. Batova, A. A. Ignatenko,
Corresponding Member of the RAS A. F. Titov**

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

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

The effect of wheat seeds treatment with salicylic acid (SA) on the expression of the *TaCu/ZnSOD*, *TaFeSOD* and *TaCAT2* genes and the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT)) in leaves at the optimal content of zinc (2 μM) and copper (0.3 μM) in root environment or there deficiencies has been studied. It was shown for the first time that seeds treatment with SA leads to an increase of the number of genes transcripts compared to untreated plants, both under optimal conditions of mineral nutrition and under zinc or copper deficiency. The activity of enzymes, especially catalase, also increases. Judging by the MDA content, this allows one to avoid increasing the intensity of lipid peroxidation (LPO) and, accordingly, the development of oxidative stress. It is concluded that the discovered positive effect of seed treatment with SA on the activity of the main enzymes of antioxidant system may underlie the stimulating effect of this phytohormone on physiological processes in plants under microelements deficiency.

Keywords: *Triticum aestivum* L., phytohormones, zinc, copper, superoxide dismutase, catalase, gene expression, enzyme activity.

УДК 575.22:595.773.4

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИ БЕЛКОВ *OUIB* И *NOM* С ГЕТЕРОХРОМАТИНОМ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2024 г. Ю. В. Пекина, В. А. Бабоса*, академик РАН П. Г. Георгиев, А. А. Федотова**

Поступило 10.11.2023 г.

После доработки 30.12.2023 г.

Принято к публикации 11.11.2023 г.

У дрозофилы большая группа активно транскрибируемых генов находится в прицентромерном гетерохроматине. Предполагается, что гетерохроматиновые белки привлекают транскрипционные факторы к промоторам генов. Ранее было показано, что два белка, *ouib* и *nom*, связываются с промоторами гетерохроматиновых генов *nvd* и *spok*. Интересно, что *ouib* и *nom* являются паралогами белка M1BP, который связывается с промоторами эухроматиновых генов. Нами было показано, что, как и M1BP, белки *quib* и *nom* взаимодействует с белком CP190, который участвует в привлечение транскрипционных комплексов на промоторы. В отличие от гетерохроматиновых белков *ouib* и *nom* не взаимодействуют с основным гетерохроматиновым белком HP1a и связываются с эухроматиновыми промоторами на политенных хромосомах из слюнных желез личинок. Полученные результаты предполагают новый механизм привлечения транскрипционных факторов в гетерохроматиновый компартмент ядра.

Ключевые слова: гетерохроматин, CP190, белки с цинковыми пальцами, архитектурные C2H2 белки, ZAD-домен.

DOI: 10.31857/S2686738924020161, **EDN:** WEMDXK

У дрозофилы эухроматин и гетерохроматин представляют собой два независимых компартмента, отличающихся набором хроматиновых белков и нуклеосомных модификаций [1, 2]. В последних исследованиях было показано, что гетерохроматин активно транскрибируется, и в нем локализованы многие гены домашнего хозяйства, которые имеют высокий уровень экспрессии [2]. При этом промоторы генов, расположенных в эухроматине и гетерохроматине, могут эффективно инициировать транскрипцию только в своем компартменте [1, 2]. В отличие от прокариот большая часть промоторов высших эукариот, включая дрозофилу и человека, не имеет выраженных мотивов, с которыми могут связываться общие факторы транскрипции [3]. Согласно одной из моделей ключевую роль в организации промоторов играют белки, содержащие кластеры цинковых пальцев C2H2-типа (C2H2-белки), которые связываются со специфичными относительно длинными (12–15 п.н.) мотивами в промоторах генов, что приводит к формированию открытого хроматина и рекрутированию TFIIID-комплекса

[3, 4]. У дрозофилы существует обширный класс белков, которые содержат на С-конце кластер, состоящий из 5 C2H2-доменов, а на N-конце находящийся ZAD (Zinc-finger Associated Domain) домен, который обеспечивает гомодимеризацию белка [5, 6]. ZAD-домен и C2H2-кластеры соединены неструктурированным линкером. Наиболее хорошо описанным у дрозофилы является белок M1BP, который связывается с мотивом, расположенным в примерно в 2000 промоторах, определяющих активность эухроматиновых генов [7, 8]. С неструктурированным линкером белка M1BP связывается белок CP190, который участвует в рекрутировании комплексов стимулирующих транскрипцию [9, 10].

Ген *m1bp* находится в кластере (85A9 на хромосомном плече 3R), который включает еще четыре гена, кодирующих ZAD-C2H2-белки – CG8159, *ranshi*, *ouib* и *nom* (рис. 1б). Все эти гены паралогичны и, предположительно, являются результатом тандемной дупликации в процессе эволюции. Неожиданно оказалось, что гены *ouib* и *nom* кодируют белки, которые связываются с промоторами генов, расположенными в гетерохроматине [11–13]. Ранее были найдены два других ZAD-C2H2-белка, *odj* и *nnk*, которые эффективно связываются с регуляторными последовательностями в гетерохроматине [14]. Было показано, что эти белки взаимодействуют с основным белком гетерохроматина HP1a, что,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН)

*E-mail: v.babosha@gmail.com

**E-mail: annafedotova@list.ru

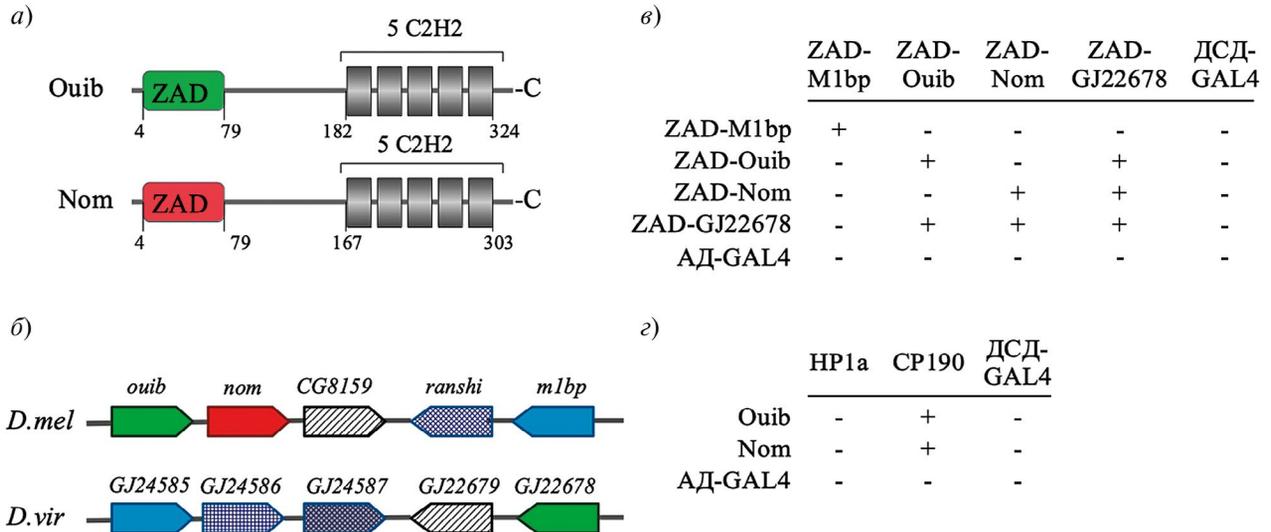


Рис. 1. Доменная структура белков *ouib* и *nom*. Указаны порядковые номера аминокислотных остатков, соответствующих границам доменов (а); геномное расположение генов *m1bp*, *ouib* и *nom* в кластере у *D. melanogaster* и *D. virilis*. Для обозначения ортологов использованы одинаковые цвета (б); исследование взаимодействия между ZAD-доменами в ДДС. Фрагменты ZAD были слиты с ДНК-связывающим доменом GAL4 (ДСД), и исследовано их взаимодействие с фрагментами, слитым с активационным доменом GAL4 (АД). Результаты представлены в колонках, где + и – означают наличие или отсутствие взаимодействия соответственно. В качестве положительного контроля проверялась способность ZAD-доменов к димеризации, а в качестве отрицательного контроля выполнялось тестирование на наличие взаимодействия только с активационным (АД) или ДНК-связывающим (ДСД) доменом белка GAL4 (в); исследование взаимодействия полноразмерных белков *Ouib* и *Nom*, слитых с АД GAL4, с полноразмерными белками CP190 и HP1a, слитыми с ДСД GAL4 (г). Остальные обозначения – такие же, как в (в).

как предполагается, определяет преимущественную локализацию этих белков в гетерохроматиновом компартменте.

Целью настоящей работы стало исследование, каким образом белки *ouib* и *nom* приобретают способность связываться с промоторами генами, находящимися в областях гетерохроматина. Ранее было показано, что ZAD-домены даже близких C2H2 паралога преимущественно формируют только гомодимеры [5, 6]. Так как ZAD-домены белков M1BP, *ouib* и *nom* имеют высокую степень сходства последовательностей, то была протестирована способность ZAD-доменов к формированию гетеродимеров. Для этого мы использовали метод дрожжевой двугибридной системы (ДДС). Были созданы конструкции, в которых последовательности ZAD-доменов белков *ouib*, *nom* и M1BP были клонированы в одну рамку считывания с активационным доменом (АД) или ДНК-связывающим доменом (ДСД) белка GAL4. Поиск ортологов у видов *Drosophila* показал, что ортолог *ouib* присутствует у всех видов, тогда как его дупликация – ген *nom* произошла позже. Так, ортологи *nom* отсутствуют у *D. virilis* (рис. 1б). Мы протестировали в ДДС взаимодействие ZAD-доменов белков *ouib* и *nom* с ортологом *ouib* *D. virilis* (GJ22678). Анализ взаимодействия показал, что ZAD-до-

мены M1BP, *ouib* и *nom* гомодимеризуются, но не образуют гетеродимеров. При этом оба белка паралога *ouib* и *nom* взаимодействуют с ортологом GJ22678 *D. virilis* (см. рис. 1в), что является дополнительным доказательством того, что они произошли от одного гена.

Известно, что многие белки, ассоциированные с гетерохроматином, взаимодействуют с белком HP1a через аминокислотный мотив *PxIxL* (где *x* – любая аминокислота). Однако, анализ последовательностей *ouib* и *nom* не выявил данного мотива. Для проверки прямого взаимодействия белков с HP1a в ДДС были получены конструкции, в которых последовательности кДНК белков *ouib* и *nom* были клонированы в одну рамку считывания с АД GAL4 и конструкция, в которой кДНК белка HP1a находилась в одной рамке считывания с ДСД GAL4. В результате, в ДДС прямое взаимодействие *ouib* и *nom* с HP1a не обнаружено (см. рис. 1г).

Многие ZAD-C2H2-белки, имеющие сайты связывания в промоторах генов, взаимодействуют с белком CP190, в том числе рекрутирование CP190 является важным для функциональной активности M1BP [9]. Мы проверили прямое взаимодействие паралога *ouib* и *nom* с CP190 в ДДС (рис. 1в). Оказалось, что *ouib* и *nom* тоже взаимодействуют с CP190, который связывается исключительно с эухромати-

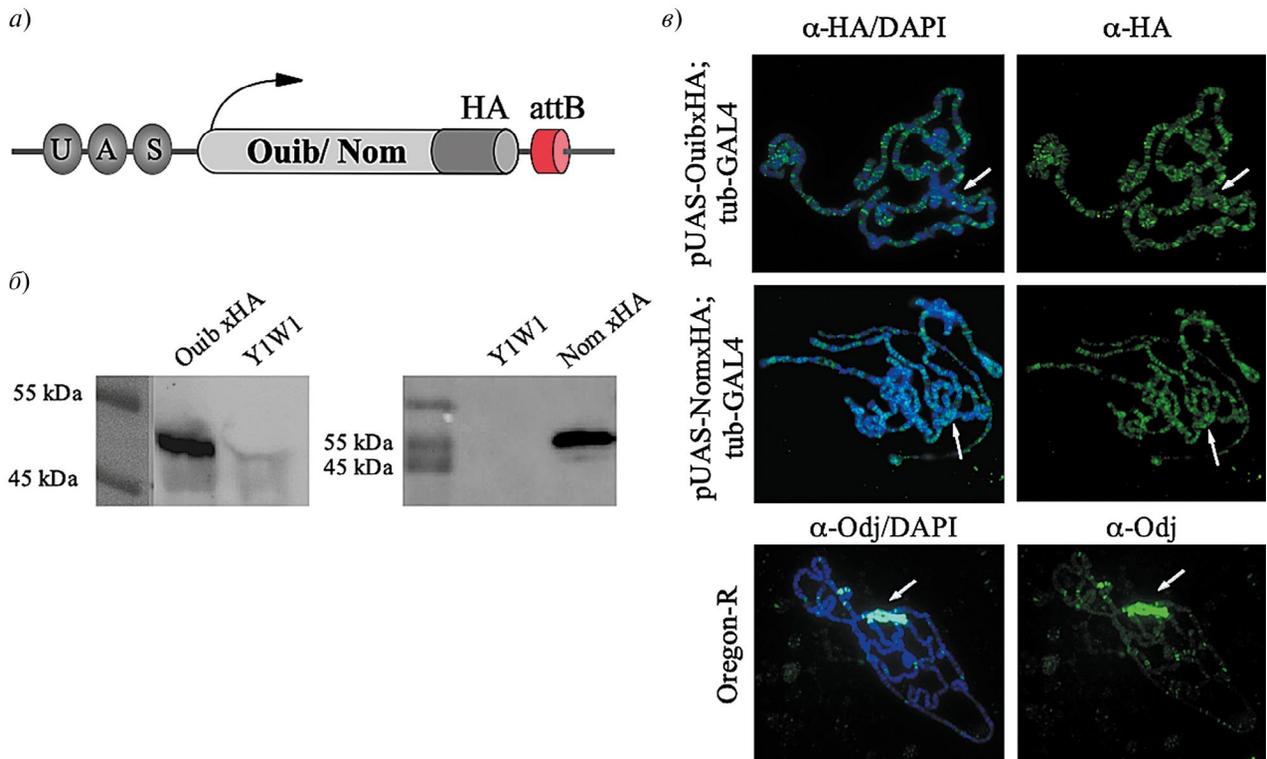


Рис. 2. Схема генетической конструкции, используемой для создания трансгенных мух, экспрессирующих белок, слитый с HA-эпитопом (а); вестерн-блот анализ белковых экстрактов из 2–3-дневных самцов, экспрессирующих OuibxHA и NomxHA, окрашенные антителами к HA-эпитопу (б); политенные хромосомы слюнных желез личинок мух, экспрессирующих OuibxHA и NomxHA. Политенные хромосомы были окрашены антителами к эпитопу HA, ДНК окрашена DAPI. Для сравнения приведено иммуноокрашивание политенных хромосом из линии Oregon-R кроличьими антителами к гетерохроматиновому белку *odj* (в). Стрелками показано положение хромоцентра на разных препаратах политенных хромосом. Масштаб – 10 мкм.

новыми промоторами. Это предполагает роль *ouib* и *nom* в организации эухроматиновых промоторов.

Для исследования полногеномного распределения сайтов связывания белков *ouib* и *nom* была использована модель политенных хромосом из ядер слюнных желез личинок третьего возраста. Политенные хромосомы состоят из междисков, которые представляют собой промоторы, контролирующие экспрессию генов домашнего хозяйства, и дисков, которые соответствуют преимущественно неактивным генам [15]. Области конститутивного гетерохроматина хорошо визуализируются в области прицентромерного гетерохроматина и в теломерах на концах хромосом. Так как *ouib* и *nom* не экспрессируются в слюнных железах, мы использовали индуцируемую систему UAS/GAL4 для экспрессии этих белков. С этой целью были созданы генетические конструкции, в которых кДНК белков *nom* и *ouib* в одной рамке считывания с эпитопом HA были клонированы в вектор pUAS, который содержит последовательность UAS (Upstream activating sequence) и *attB*-сайт для интеграции в геном дрозофилы (рис. 2а). Полученные конструкции были встроены в одно и тоже место генома в сайт *attP* 38D

с использованием системы интеграции *phiC31*. Для эктопической экспрессии генов мы скрещивали мух линии, содержащей конструкт pUAS-OuibxHA или pUAS-NomxHA, с мухами линии, экспрессирующей GAL4 под контролем сильного тубулинового промотора (*tub:GAL4*), который обеспечивает высокий уровень транскрипции во всех тканях. Экспрессию белка подтверждали анализом белкового лизата из взрослых мух методом вестерн-блот с использованием антител к HA (см. рис. 2б).

Иммуноокрашивание политенных хромосом показало неожиданные результаты. Оказалось, что белки *ouib* и *nom* имеют множество сайтов связывания в междисках политенных хромосом, но при этом не наблюдается связывания в прицентромерных гетерохроматиновых районах. Таким образом, эктопически экспрессируемые белки не рекрутируются сами по себе в гетерохроматиновый компартмент (см. рис. 2в). Это отличает белки *nom* и *ouib* от белка *odj*, который активно связывается с гетерохроматином политенных хромосом (см. рис. 2в).

Наиболее вероятно, что ген, кодирующий M1BP, является основателем кластера генов (85A9), так как его экспрессия намного выше и белок имеет кон-

сервативные среди дрозофил мотивы связывания в промоторах большой группы генов. Остальные гены кластера, за исключением *ranshi*, имеют слабый уровень экспрессии и, вероятно, связываются с промоторами небольшого количества генов. Так, было показано, что белки *nom* и *ouib* определяют активность промоторов генов *nvd* и *spok*, расположенных в гетерохроматине [11, 12]. При этом активация этих промоторов является основной функцией белков *nom* и *ouib*. Как и M1BP, белки *nom* и *ouib* связываются с CP190, рекрутирование которого на промоторы определяет формирование зоны открытого хроматина и активацию транскрипции. Таким образом, белки *nom* и *ouib* по строению и функциям похожи на M1BP. Более того, при избыточной экспрессии белки *nom* и *ouib* связываются с промоторами (междисками) генов домашнего хозяйства, которые находятся в эухроматине и не наблюдается их ассоциации с прицентромерным гетерохроматином. ZAD-домены трех близких паралога M1BP, *nom* и *ouib* формируют только гомодимеры. Таким образом, ZAD-домены определяют функциональную независимость недавно возникших C2H2-белков и блокируют их взаимодействие с M1BP. Полученные результаты свидетельствуют о том, что механизм рекрутирования *nom* и *ouib* в гетерохроматиновые районы принципиально отличается от описанного ранее для *odj* и *nnk*, для которых показано взаимодействие через консенсусный мотив с HP1a. Белки *nom* и *ouib* не взаимодействуют напрямую с основным гетерохроматиновым белком HP1a.

Наиболее вероятно, что *nom* и *ouib* рекрутируются в гетерохроматиновый компартмент с помощью белка-партнера, который также участвует в формировании активных промоторов *nvd* и *spok* генов. Одним из потенциальных белков-партнеров может быть большой (около 2000 а.о.) ZAD-C2H2 белок Molting Defective (Mld), который также связывается с промоторами *nvd* и *spok* [12]. Белок Mld эффективно экспрессируется на всех стадиях развития и, вероятно, имеет много различных функций в регуляции экспрессии генов. Необходимы дальнейшие исследования для ответа на вопрос, могут ли белки *ouib* и *nom* рекрутироваться в гетерохроматиновый компартмент в результате взаимодействия с другими ZAD-C2H2-белками, которые ассоциированы с основными гетерохроматиновыми белками.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет Российского научного фонда, грант № 22-24-00894.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

В соответствии с пунктом 3 главы 1 Директивы 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г. о защите животных, ис-

пользуемых в научных целях, требования биоэтики не распространяются на объект данного исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтверждают отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Marsano R.M., Giordano E., Messina G., et al.* A New Portrait of Constitutive Heterochromatin: Lessons from *Drosophila melanogaster* // *Trends in Genetics*. 2019. Vol. 35. A New Portrait of Constitutive Heterochromatin. № 9. P. 615–631.
2. *Saha P., Sowpati D. T., Soujanya M., et al.* Interplay of pericentromeric genome organization and chromatin landscape regulates the expression of *Drosophila melanogaster* heterochromatic genes // *Epigenetics & Chromatin*. 2020. Vol. 13. № 1. P. 41.
3. *Vo Ngoc L., Kassavetis G.A., Kadonaga J.T.* The RNA Polymerase II Core Promoter in *Drosophila* // *Genetics*. – 2019. – Vol. 212. – № 1. – P. 13-24.
4. *Kyrchanova O. V., Bylino O. V., Georgiev P. G.* Mechanisms of enhancer-promoter communication and chromosomal architecture in mammals and *Drosophila* / O. V. Kyrchanova, O. V. Bylino, P. G. Georgiev // *Frontiers in Genetics*. 2022. Vol. 13. P. 1081088.
5. *Bonchuk A.N., Boyko K., Nikilaeva A.Y., et al.* Structural insights into highly similar spatial organization of zinc-finger associated domains with a very low sequence similarity // *Structure* (London, England: 1993). 2022. Vol. 30. № 7. P. 1004-1015.e4.
6. *Bonchuk A.N., Boyko K., Fedotova A. A., et al.* Structural basis of diversity and homodimerization specificity of zinc-finger-associated domains in *Drosophila* // *Nucleic Acids Research*. 2021. Vol. 49. № 4. P. 2375-2389.
7. *Baumann D.G., Gilmour D.S.* A sequence-specific core promoter-binding transcription factor recruits TRF2 to coordinately transcribe ribosomal protein genes // *Nucleic Acids Research*. 2017. Vol. 45. № 18. P. 10481–10491.
8. *Li J., Gilmour D.S.* Distinct mechanisms of transcriptional pausing orchestrated by GAGA factor and M1BP, a novel transcription factor / J. Li, D.S. Gilmour // *The EMBO Journal*. 2013. Vol. 32. № 13. P. 1829–1841.
9. *Bag I., Shue C., Rosin L.* M1BP cooperates with CP190 to activate transcription at TAD borders and promote chromatin insulator activity // *Nature Communications*. 2021. Vol. 12. № 1. P. 4170.
10. *Sabirov M., Popovich A., Boyko K., et al.* Mechanisms of CP190 Interaction with Architectural Proteins in *Drosophila Melanogaster* // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22. № 22. P. 12400.
11. *Komura-Kawa T., Hirota K., Shimada-Niwa Y., et al.* The *Drosophila* Zinc Finger Transcription Factor Ouija Board Controls Ecdysteroid Biosynthesis through Specific Regulation of spookier // *PLoS genetics*. 2015. Vol. 11. № 12. P. e1005712.
12. *Uryu O., Komura-Kawa T., Kamiyama T., et al.* Cooperative Control of Ecdysone Biosynthesis in *Drosophila* by Tran-

- scription Factors Séance, Ouija Board, and Molting Defective // *Genetics*. 2018. Vol. 208. № 2. P. 605–622.
13. Niwa Y.S., Niwa R. Ouija board: A transcription factor evolved for only one target in steroid hormone biosynthesis in the fruit fly *Drosophila melanogaster* // *Transcription*. 2016. Vol. 7. Ouija board. № 5. P. 196–202.
14. Kasinathan B., Colmenares S. U., McConnell H., et al. Innovation of heterochromatin functions drives rapid evolution of essential ZAD-ZNF genes in *Drosophila* // *eLife*. 2020. Vol. 9. P.e63368.
15. Demakova O.V., Demakov S.A., Boldyreva L.V., et al. Faint gray bands in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes are formed by coding sequences of housekeeping genes // *Chromosoma*. 2020. Vol. 129. № 1. P. 25–44.

STUDY OF THE ASSOCIATION OF *OUIB* AND *NOM* WITH HETEROCHROMATIN IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Y. V. Pekina, V. A. Babosha[#], academician of the RAS P. G. Georgiev, A. A. Fedotova^{##}

Institute of Gene Biology RAS, Moscow, Russian Federation

[#]*E-mail: v.babosha@gmail.com*

^{##}*E-mail: annafedotova@list.ru*

In *Drosophila*, a large group of actively transcribed genes is located in pericentromeric heterochromatin. It is assumed that heterochromatic proteins attract transcription factors to gene promoters. Two proteins, *ouib* and *nom*, were previously shown to bind to the promoters of the heterochromatic genes *nvd* and *spok*. Interestingly, *ouib* and *nom* are paralogs of the M1BP protein, which binds to the promoters of euchromatic genes. We have shown that, like M1BP, the *ouib* and *nom* proteins bind to CP190, which is involved in the recruitment of transcription complexes to promoters. Unlike heterochromatic proteins, *ouib* and *nom* do not interact with the major heterochromatic protein HP1a and bind to euchromatic promoters on polytene chromosomes from the larval salivary glands. The results suggest a new mechanism for the recruitment of transcription factors into the heterochromatic compartment of the nucleus.

Keywords: heterochromatin, CP190, zinc finger protein, C2H2-type architectural proteins, zinc-finger associated domain.

УДК 571.27

УРОВЕНЬ ПРОТИВОВИРУСНЫХ АНТИТЕЛ К БЕЛКУ EBNA-1 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ НЕ ЗАВИСИТ ОТ ТЯЖЕСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

© 2024 г. Л. А. Овчинникова¹, С. С. Джелад¹, Т. О. Симанив², М. Н. Захарова²,
академик РАН А. Г. Габиров^{1, 3, *}, Я. А. Ломакин^{1, **}

Поступило 10.11.2023 г.

После доработки 22.11.2023 г.

Принято к публикации 23.11.2023 г.

Рассеянный склероз (РС) – иммуноопосредованное демиелинизирующее заболевание, без терапии приводящее к глубокой инвалидизации. РС поражает около 1% населения Земли трудоспособного возраста, преимущественно женщин. Механизмы, запускающие развитие РС, остаются непознанными, что служит причиной трудностей в выборе терапии. В связи с этим исследования в области активации процесса демиелинизации приобретают особое значение. Недавние работы выявили прямую корреляцию риска развития РС с инфицированием вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ). В результате анализа титра ВЭБ-специфичных антител среди больных РС и здоровых доноров русской этнической группы было подтверждено, что РС характеризуется повышенным уровнем сывороточных IgG, связывающих EBNA-1 (EBV nuclear antigen 1). Количество пациентов с повышенным уровнем EBNA-1-специфичных антител статистически достоверно не различается у двух групп с диаметрально противоположными течениями РС: доброкачественным РС или высокоактивным РС. Мы предполагаем, что основной вклад ВЭБ в развитии РС обусловлен инициацией заболевания и не влияет на тяжесть его течения.

Ключевые слова: рассеянный склероз, РС, EBNA-1, аутоантитела, ВЭБ, вирус Эпштейна – Барр.

DOI: 10.31857/S2686738924020174, **EDN:** WEJGMJ

Рассеянный склероз (РС) – хроническое иммуноопосредованное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы (ЦНС). РС – крайне гетерогенное заболевание, развитие которого может быть спровоцировано сочетанием таких факторов, как генетическая предрасположенность, бактериальные и вирусные инфекции (в первую очередь – герпесвирусы), неблагоприятная окружающая среда и наличие вредных привычек [1]. При этом механизм инициации данного заболевания до конца не установлен. В последнее десятилетие особую роль в развитии данного заболевания отводят вирусу Эпштейна – Барр (ВЭБ)

[2,3]. Было показано, что риск развития РС увеличивается в 32 раза при инфицировании ВЭБ [2]. При этом противовирусные антитела обнаруживаются в крови в среднем за 10 лет до первых клинических проявлений РС [4]. Вирус поражает В-клетки человека и после этого переходит в латентную фазу, во время которой экспрессия вирусных белков заметно снижается по сравнению с активной инфекцией [5]. Данный процесс частично способствует сохранению инфицированных В-клеток и поддержанию инфекции в организме человека. Однако наиболее важные для поддержания жизнедеятельности ВЭБ-белки, среди которых наиболее изучен ядерный антиген-1 (EBNA-1), необходимый для сохранения вирусного генома, продолжают экспрессироваться даже в латентной фазе [6].

Ранее у пациентов с РС было показано наличие кросс-реактивных моноклональных антител, одновременно узнающих фрагмент вирусного антигена EBNA-1 (386–405 а.о.) и аутоантигена глиальных клеток GlialCAM (370–389 а.о.) [7]. Изучение титра антител к вирусным антигенам у пациентов с РС поможет прояснить, как связаны между собой уровень активации иммунной системы при ответе

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

² Научный центр неврологии, Москва, Россия

³ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: gabibov@gmail.com

**E-mail: yasha.l@bk.ru

Таблица 1. Характеристика пациентов с РС, БАС, ЗСОНМ и здоровых доноров, участвующих в исследовании

	ЗД	РС	ДРС	ВАРС	БАС	ЗСОНМ
Количество	19	29	9	20	14	5
Возраст (лет)	42 ± 9	39 ± 11	48 ± 11	35 ± 8	56 ± 9	55 ± 18
Пол (% женщин)	52%	66%	75%	44%	64%	100%
Длительность заболевания 1–5 лет	–	51.7%	11.1%	70%	100%	60%
Длительность заболевания 6–10 лет	–	13.8%	11.1%	15%	–	20%
Длительность заболевания Более 10 лет	–	34.5%	77.8%	15%	–	20%
EDSS		3.7 ± 1.8	3.6 ± 1.7	3.8 ± 2.0	–	–

Примечание: ЗД – здоровые доноры; РС – рассеянный склероз; ДРС – доброкачественный РС; ВАРС – высокоактивный РС; EDSS – расширенная шкала нарушений жизнедеятельности Куртцке [12] (от 0 до 10, где 0 – норма, 10 – смерть от РС).

на ВЭБ и тяжесть протекания РС. Таким образом, целью нашего исследования являлось определение уровня противовирусных антител к EBNA-1 (386–405 а.о.) в крови пациентов с агрессивным течением РС (высокоактивный РС (ВАРС) и менее тяжелой формой заболевания – доброкачественным РС (ДРС) [8, 9].

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Определение количества антиген-специфичных антител к EBNA-1 (386–405 а.о.) в сыворотках крови пациентов с РС и здоровых доноров (ЗД) проводилось методом иммуноферментного анализа (ИФА). В данной работе мы рассматриваем два клинических варианта течения ремиттирующе-рецидивирующего РС – доброкачественный РС (ДРС) и более агрессивный – высокоактивный РС (ВАРС) [8, 9]. ДРС характеризуется медленной прогрессией при отсутствии специфичного лечения и относительно низким значением расширенной шкалы нарушений жизнедеятельности Куртцке (EDSS) – менее 4. При этом у пациентов с данной формой РС часто выявляются различные когнитивные нарушения [10]. Для более тяжелой формы заболевания – ВАРС характерны высокая скорость образования новых очагов демиелинизации в ЦНС и неполное восстановление в период ремиссии, наличие двух и более рецидивов за год [11]. Для сравнения РС с другими неврологическими заболеваниями мы измерили уровень противовирусных антиген-специфичных антител у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом (БАС) и заболеваниями спектра оптиконевромиелита (ЗСОНМ). Данные заболевания характеризуются частично перекрывающейся с РС симптоматикой, однако их патогенез существенно отличается. Исследование уровня антительного ответа на вирусные антигены проводили на выборках ЗД ($n = 19$) и РС

($n = 29$) (с делением на ДРС ($n = 9$) и ВАРС ($n = 20$), БАС ($n = 14$), ЗСОНМ ($n = 5$)) (табл. 1).

Определение уровня антительного ответа проводилось с использованием химически синтезированного пептида EBNA-1 (386–405 а.о. – SQSSSSGSPRRPPPGRRPF) с чистотой >90%, что позволяет избежать ложно-положительного сигнала от связывания неспецифичными антителами сыворотки побочных продуктов, часто образующихся при прокариотической экспрессии белков. Пептид наносился на дно лунки сорбирующей плашки в концентрации 1 мкг/мл в карбонатном буфере (pH = 9.0), инкубация длилась 16 ч при +4 °С. Затем оставшиеся места связывания на дне лунки блокировались раствором 2% сухого обезжиренного молока в карбонатном буфере (pH = 9.0) в течение 1 ч при помешивании, 37 °С. Сыворотка крови разводилась в 100 раз в конъюгатном буфере (фосфатно-солевой буфер (pH = 7.4), 0.05% “Твин-20”, 0.5% сухого обезжиренного молока). После инкубации при комнатной температуре в течение 1 ч при помешивании, плашки отмывались 5 раз буфером для отмывки (фосфатно-солевой буфер (pH = 7.4), 0.1% “Твин-20”). Связавшиеся антитела детектировались вторичными антителами к F(ab')₂ фрагменту антител человека класса IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, A2290). После инкубации со вторичными антителами проводили 6 циклов отмывки с последующим добавлением 3, 3', 5, 5'-тетраметилбензидаина гидрохлорида (ТМБ), который служит субстратом для пероксидазы хрена. Реакцию останавливали добавлением раствора 10%-ной серной кислоты. Регистрация сигнала связывания осуществлялась с использованием плашечного многофункционального анализатора Varioskan LUX при длине волны 450 нм. Для статистической обработки результатов

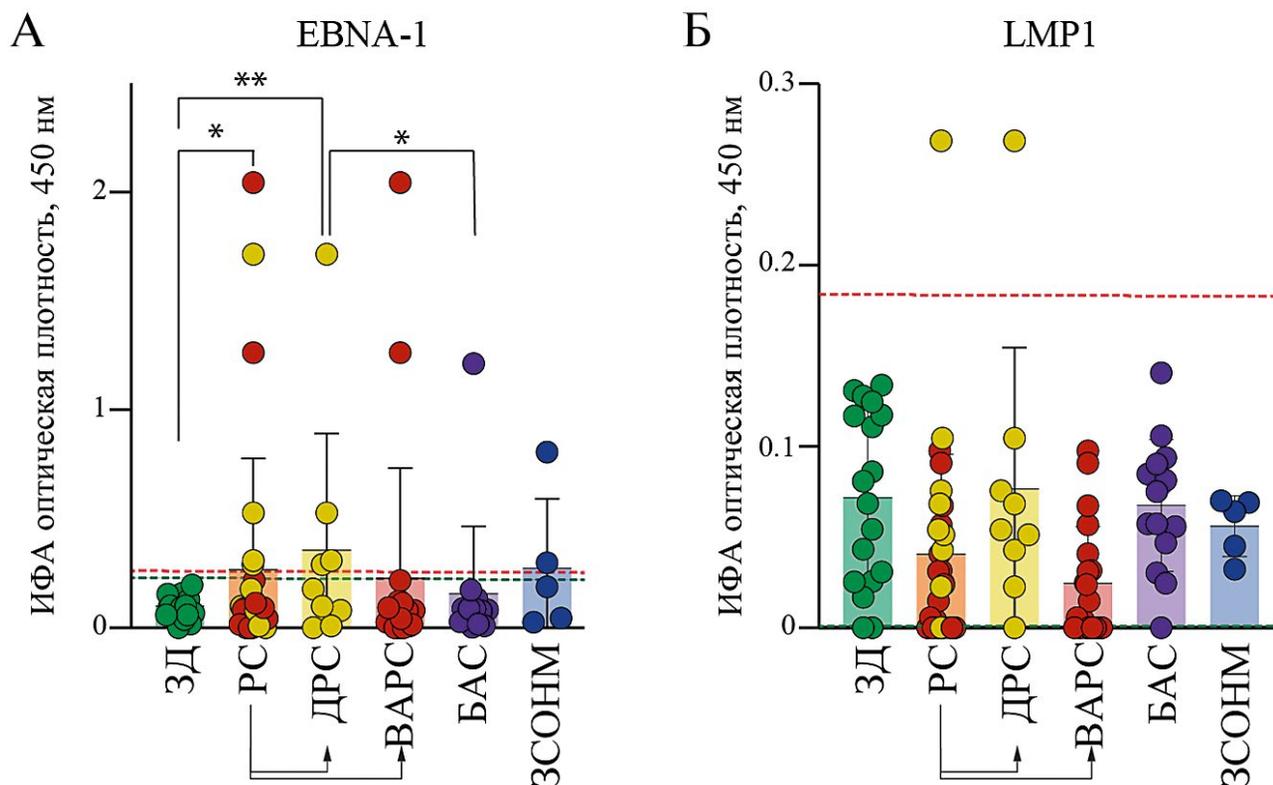


Рис. 1. Сывороточный уровень антиген-специфических IgG к фрагментам ВЭБ: связывание химически синтезированного пептида EBNA-1 (386–405 а.о.) (а); связывание химически синтезированного контрольного пептида LMP1 (7–26 а.о.) (б). ЗД – здоровые доноры, РС – пациенты с рассеянным склерозом, ДРС – пациенты с доброкачественным рассеянным склерозом, ВАРС – пациенты с высокоактивным рассеянным склерозом, БАС – пациенты с боковым амиотрофическим склерозом, ЗСОНМ – пациенты с заболеванием спектра оптиконевромиелита. Красной пунктирной линией обозначено пороговое значение оптической плотности, выше которого сыворотка считается серопозитивной на исследуемый антиген. Пунктирной зеленой линией обозначено контрольный сигнал связывания исследуемого антигена препаратом IVIG (объединенные IgG от 1000 здоровых доноров) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, Хи-квадрат Пирсона).

использовали программное обеспечение GraphPad Prism, версия 9.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для подтверждения измерения титра антител, специфически связывающих именно кросс-реактивный вирусный пептид EBNA-1 (386–405 а.о.), потенциально ассоциированный с развитием РС, а не общий титр противовирусных антител, был дополнительно проведен анализ антиген-специфических антител к контрольному фрагменту другого белка ВЭБ латентной фазы – LMP1 (latent membrane protein 1). Использование данного контроля позволяет удостовериться, что повышенный уровень реактивности антител к EBNA-1 (386–405 а.о.) у пациентов с РС не связан с иммуновоспалением в целом и персистенцией ВЭБ в организме. Результаты проведенного исследования представлены на рис. 1. Уровень противовирусного антительного ответа к EBNA-1 (386–405 а.о.) достоверно повышен

для пациентов с РС независимо от тяжести заболевания по сравнению с ЗД. Также для пациентов с ДРС наблюдается статистически значимое различие в количестве серопозитивных доноров по сравнению с ЗД. Внутри группы РС уровень связывания вирусного антигена EBNA-1 (386–405 а.о.) и количество серопозитивных доноров статистически значимо не отличается между пациентами с ДРС и ВАРС. В отличие от РС ни для одного из других заболеваний (БАС и ЗСОНМ) не было обнаружено статистически достоверной разницы в уровне антиген-специфических антител к EBNA-1 (386–405 а.о.) по сравнению со ЗД. Необходимо заметить, что уровень связывания пептида LMP1 сывороточными антителами пациентов с РС не отличается от уровня связывания в группах ЗД и пациентов с другими неврологическими заболеваниями и остается на относительно низком уровне, что подтверждает взаимосвязь РС и антиген-специфических антител к фрагменту EBNA-1 (386–405 а.о.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам последних исследований можно практически наверняка заключить, что ВЭБ является иницирующим фактором РС, однако его влияние на тяжесть протекания РС до конца не установлено (рис. 2). Одним из наиболее вероятных элементов ВЭБ, индуцирующих образование кросс-реактивных патогенных антител при РС, считается антиген EBNA-1 (386–405 а.о.). В данной работе мы сравнили уровни связывания синтетического пептида вирусного антигена EBNA-1 (386–405 а.о.) антителами из сывороток крови пациентов с различным течением РС (ДРС и ВАРС). По нашим данным, уровень противовирусных антител в сыворотке не зависит от тяжести течения РС. На основании полученных данных можно предположить, что ВЭБ действует скорее как инициатор, нежели как активатор РС (см. рис. 2). Однако роль ВЭБ в прогрессировании РС до конца не ясна, и возможно, дальнейшее изучение этого влияния и более детальный анализ пациентов с первично- и вторично-прогрессирующими типами течения РС помо-

гут скорректировать терапию таким образом, чтобы замедлить развитие данного заболевания.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 17-74-30019.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Все исследования с клиническими образцами проводились в соответствии с рекомендациями, изложенными в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Научного центра неврологии. У всех пациентов, включенных в исследование, было получено письменное согла-

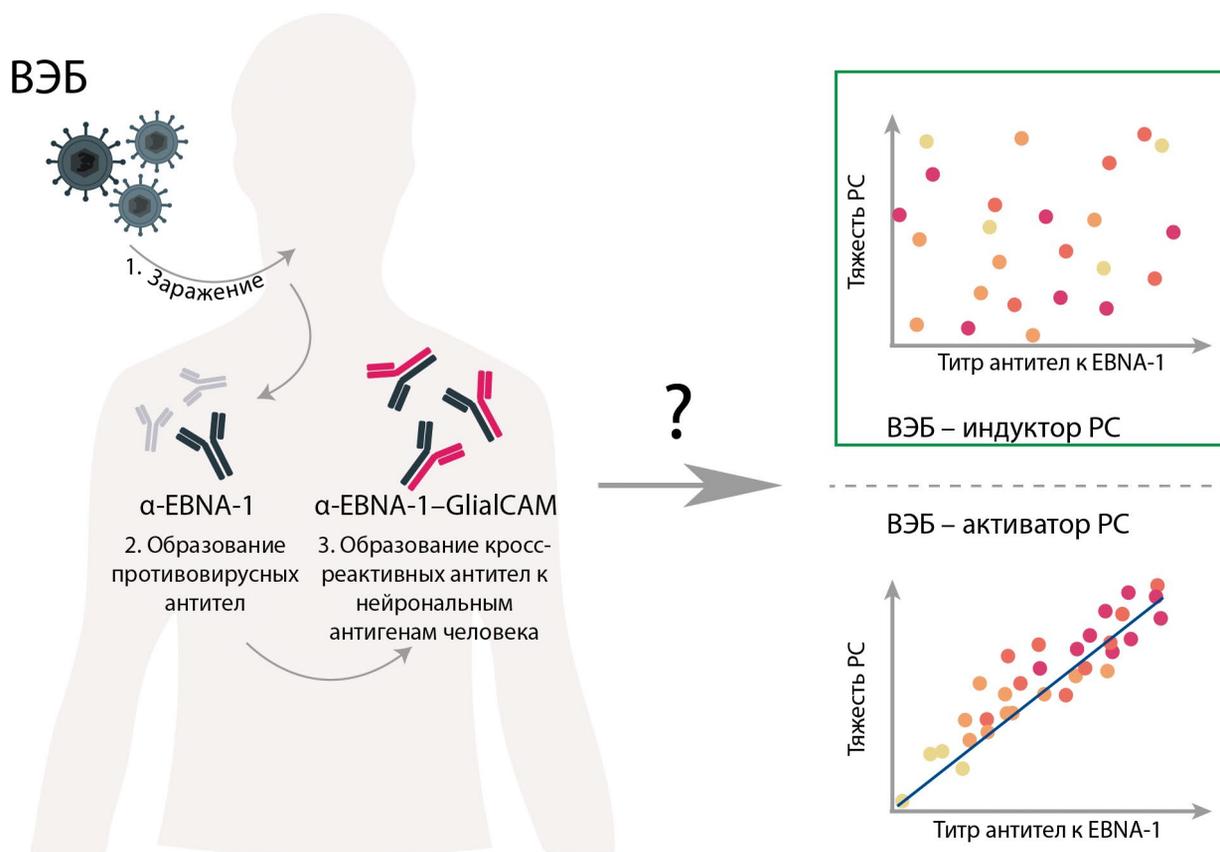


Рис. 2. Предполагаемая схема участия вируса Эпштейна – Барр в развитии рассеянного склероза. 1. Вирус проникает в организм человека и заражает В-клетки. 2. Происходит накопление вирусных антигенов (например, EBNA-1, VCA и др.) и образование противовирусных антител к данным антигенам. 3. Образовавшиеся противовирусные иммуноглобулины в процессе созревания и соматической гипермутации становятся кросс-реактивными к нейрональным антигенам человека. ВЭБ – вирус Эпштейна – Барр, РС – рассеянный склероз.

сие. Все клинические образцы были использованы в работе после их деидентификации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Baecher-Allan C., Kaskow B.J., Weiner H.L.* Multiple sclerosis: mechanisms and immunotherapy // *Neuron*. 2018a. Т. 97. № 4. С. 742–768.
2. *Bjornevik K. u др.* Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis // *Science*. 2022b. Т. 375. № 6578. С. 296–301.
3. *Lomakin Y. u др.* Exposure to the Epstein-Barr Viral Antigen Latent Membrane Protein 1 Induces Myelin-Reactive Antibodies In Vivo // *Front. Immunol*. 2017c. Т. 8. С. 777.
4. *Jons D. u др.* Seroreactivity against lytic, latent and possible cross-reactive EBV antigens appears on average 10 years before MS induced preclinical neuroaxonal damage // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr*. 2023d.
5. *Liu M., Wang R., Xie Z.* T cell-mediated immunity during Epstein-Barr virus infections in children // *Infect. Genet. Evol.* 2023e. Т. 112. С. 105443.
6. *Kang M.-S., Kieff E.* Epstein-Barr virus latent genes // *Exp. Mol. Med.* 2015f. Т. 47. № 1. С. e131.
7. *Lanz T.V. u др.* Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM // *Nature*. 2022g. Т. 603. № 7900. С. 321–327.
8. *Lomakin Y.A. u др.* Multiple Sclerosis Is Associated with Immunoglobulin Germline Gene Variation of Transitional B Cells // *Acta Naturae*. 2022h. Т. 14. № 4. С. 84–93.
9. *Lomakin Y.A. u др.* Deconvolution of B cell receptor repertoire in multiple sclerosis patients revealed a delay in tBreg maturation // *Front. Immunol.* 2022i. Т. 13. С. 803229.
10. *Correale J., Ysrraelit M.C., Fiol M.P.* Benign multiple sclerosis: does it exist? // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2012j. Т. 12. № 5. С. 601–609.
11. *Díaz C., Zarco L.A., Rivera D.M.* Highly active multiple sclerosis: An update // *Mult. Scler. Relat. Disord.* 2019k. Т. 30. С. 215–224.
12. *Kurtzke J.F.* Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS) // *Neurology*. 1983l. Т. 33. № 11. С. 1444–1452.

THE LEVEL OF ANTI-VIRAL ANTIGEN-SPECIFIC ANTIBODIES TO EBNA-1 IN THE SERUM OF MS PATIENTS DOES NOT DEPEND ON THE SEVERITY OF THE DISEASE

**L. A. Ovchinnikova^a, S. S. Dzhelad^a, T. O. Simaniv^b, M. N. Zakharova^b,
Academician of the RAS A. G. Gabibov^{a, #}, Ya. A. Lomakin^{a, ##}**

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

^b*Research Center of Neurology, Moscow, Russian Federation*

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

[#]*E-mail: gabibov@gmail.com*

^{##}*E-mail: yasha.l@bk.ru*

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune neurodegenerative disease leading to inevitable disability and primarily affecting the young and middle-aged population. Recent studies have shown a direct correlation between the risk of MS development and Epstein-Barr virus (EBV) infection. Analysis of the titer of EBV-specific antibodies among patients with MS and healthy donors among Russian population confirmed that MS is characterized by an increased level of serum IgG binding EBNA-1 (EBV nuclear antigen 1). The number of patients with elevated levels of EBNA-1-specific antibodies does not differ statistically significantly between two groups with diametrically opposite courses of MS: benign MS or highly active MS. It can be assumed that the primary link between EBV and the development of MS is restricted to the initiation of the disease and does not impact its severity.

Keywords: MS, multiple sclerosis, EBNA-1, autoantibodies, EBV, Epstein – Barr virus.

УДК 577.3:599.323.4

ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ ВЫСОКИХ ДОЗ ИОНОВ УГЛЕРОДА И РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ КЛЕТОК АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА *EX VIVO*

© 2024 г. Член-корреспондент РАН В. Е. Балакин¹, Т. А. Белякова^{1,*},
О. М. Розанова², Е. Н. Смирнова², Н. С. Стрельникова¹, Е. А. Кузнецова²

Поступило 26.12.2023 г.

После доработки 19.01.2024 г.

Принято к публикации 22.01.2024 г.

Исследовали действие ионов углерода (¹²C) с энергией 400 МэВ/нуклон на динамику индукции и скорость роста солидных опухолей у мышей при облучении асцитных клеток карциномы Эрлиха (АКЭ) *ex vivo* в дозах 5–30 Гр относительно действия равноэффективных доз рентгеновского излучения (РИ). Динамика индукции опухолей при действии ¹²C и РИ имела сходный характер и зависела от дозы в течение 3 мес наблюдения. Величина латентного периода при облучении как клеток ¹²C, так и РИ, увеличивалась с ростом дозы, а интервал индукции опухолей уменьшался. Скорость роста опухолей после облучения клеток АКЭ *ex vivo* не зависела ни от дозы, ни от вида излучения. Доза, при которой в течение 90 сут не индуцируются опухоли АКЭ, для ионов углерода была 30 Гр, для РИ – 60 Гр. Величина относительной биологической эффективности ионов углерода, рассчитанная по равноэффективной дозе 50%-ной вероятности появления опухолей, равнялась 2.59.

Ключевые слова: асцитная карцинома Эрлиха, *ex vivo*, ионы углерода, рентген, ОБЭ, мыши.

DOI: 10.31857/S2686738924020189, EDN: WEFMBS

Ионная радиотерапия представляет собой перспективный метод лечения опухолей, резистентных к конвенциональной фотонной терапии, и опухолей, расположенных вблизи критических органов [1, 2]. В настоящее время в мире в центрах ионной терапии пролечено более 45 000 пациентов (<https://www.rtcog.ch/>). Применение пучков тяжелых ионов в онкологии дает огромное преимущество перед фотонной терапией из-за особенностей прохождения ионов через ткани организма: относительно низкая энергия частиц на входе в биологическую ткань и наличие пика Брэгга, при котором происходит максимальное энерговыделение в конце пробега частицы на заранее заданной глубине, непосредственно в опухоли, а затем резкое падение энергии до нуля, что позволяет более эффективно подавлять рост опухолей и не повреждать окружающие здоро-

вые ткани, в отличие от рентгеновского излучения [3]. Лучевая терапия ионами углерода по сравнению с другим видом адронной терапии – протонной – является более эффективной, поскольку характеризуется высоким значением относительной биологической эффективности (ОБЭ) частиц от 2 до 3 в зависимости от типа клеток, доз и метода регистрации повреждений [4–6]. Поскольку высокое значение ОБЭ ионов углерода обусловлено меньшей зависимостью гибели клеток от фаз клеточного цикла, содержания кислорода в опухоли, преимущественной индукцией кластерных труднорепарированных повреждений ДНК, подавлением некоторых этапов пострадиационной репарации, это позволяет рассматривать ионы углерода как эффективный инструмент уничтожения разных по радиочувствительности клеток солидных опухолей, которые характеризуются экстремально гипоксическими условиями по сравнению с окружающими тканями. Специфика биологического действия ионов углерода также позволяет предположить, что этот вид излучения будет эффективным и в отношении опухолевых стволовых клеток (ОСК), которые обладают потенциалом самообновления, устойчивы к химио- или лучевой терапии, провоцируют рецидивы опухоли и метастазирование за счет стимулирования к делению и дифференцировке после

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

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

*E-mail: belyakovata@lebedev.ru

гибели основной массы опухолевых клеток [7–9]. Проблема радиоустойчивости ОСК в настоящее время остроактуальна и далека до решения. Одним из перспективных подходов к решению проблем резистентности, метастазирования и рецидивирования опухолей, обусловленных, в том числе, ОСК, является, на наш взгляд, применение ионной терапии, которая позволяет использовать более высокие, по сравнению с конвенциональной, дозы облучения. В данной работе используется модель индукции солидных опухолей, возникающих после имплантации мышам облученных опухолевых клеток, в пуле которых сохраняются зависимые от дозы уровни ОСК и клетки в сенесцентном состоянии.

Целью работы являлось изучение закономерностей индукции и роста опухолей на модели солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) у мышей после облучения асцитных клеток *ex vivo* высокими дозами ускоренных ионов углерода и рентгеновского излучения.

Эксперименты проводили на 2-месячных самцах мышей колонии SHK (31–35 г), которые содержались в стандартных условиях вивария Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (Пушино, Россия). В качестве модели опухолевого роста была использована солидная форма АКЭ [10]. Опухолевые клетки были получены из криобанка культур клеток Института биофизики клетки Российской академии наук (ИБК РАН). Условия поддержания асцитной культуры *in vivo* и подготовки клеток для облучения описаны ранее [11].

Суспензию клеток АКЭ в концентрации $20 \cdot 10^6$ клеток/мл облучали в эппендорфе объемом 1.5 мл при комнатной температуре: 1) ионами

углерода (^{12}C) в модифицированном пике Брэгга ($E = 400$ МэВ, 0.5 Гр/мин, ЛПЭ ~ 39 кэВ/мкм) в дозах 5; 10; 20 и 30 Гр на моноэнергетическом пучке с энергией 400 МэВ/нуклон ускорительного комплекса У-70 на базе ФГБУ “Институт физики высоких энергий имени А. А. Логунова НИЦ “Курчатовский институт” (Протвино); 2) рентгеновским излучением (РИ) в дозах 20; 30; 40 и 60 Гр на установке РУТ (200 кВ, 1 Гр/мин, ЛПЭ ~ 2 кэВ/мкм) в ЦКП “Источники излучения” (ИБК, Пушино). Дозы были выбраны как равноэффективные исходя из литературных и наших данных по определению ОБЭ при действии ионов углерода *in vivo* и *in vitro* [12, 13].

После облучения мышам имплантировали клетки АКЭ в количестве $2 \cdot 10^6$ в объеме 0.1 мл внутримышечно в бедро левой лапы. Мышам контрольной группы инокулировали такое же количество необлученных клеток АКЭ. В каждой группе было 10 мышей, и для каждой экспериментальной точки было проведено не менее 2 повторов.

После инокуляции клеток АКЭ ежедневно наблюдали за частотой индукции и скоростью роста солидных опухолей у мышей в течение 90 сут. Латентный период оценивали как временной интервал между датой инокуляции клеток карциномы Эрлиха и датой появления пальпируемой опухоли, объем которой был равен 0.4 см^3 (V_0). Дважды в неделю с помощью электронного штангенциркуля с точностью ± 0.01 мм измеряли три ортогональных диаметра опухоли, и объем опухоли (V) рассчитывали по стандартной формуле. Динамику роста опухоли оценивали по среднему относительному объему в зависимости от дней после появления, нормализованному к первоначальному объему

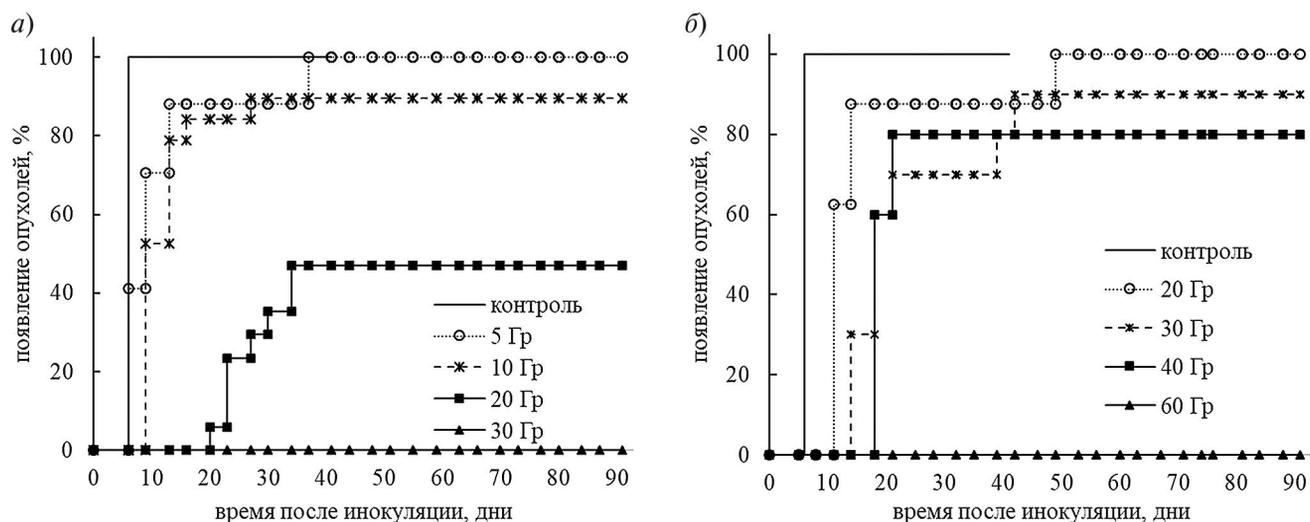


Рис. 1. Динамика появления опухолей у мышей после инокуляции клеток АКЭ, облученных: (а) ионами углерода в диапазоне доз 5–30 Гр; (б) РИ в дозах 20–60 Гр.

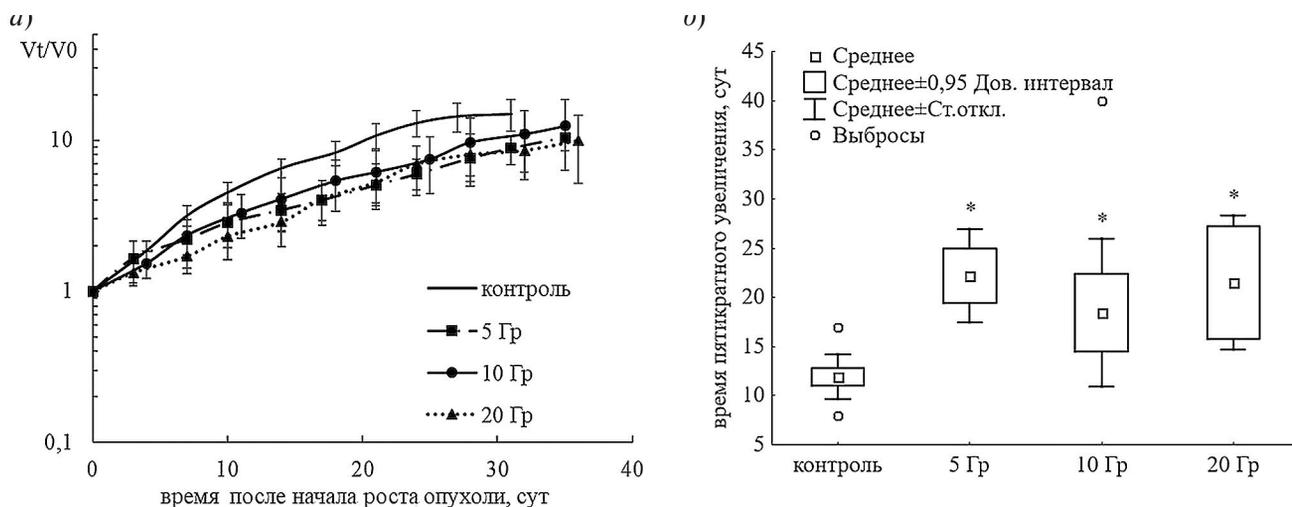


Рис. 2. Динамика роста опухолей у мышей после инокуляции суспензии клеток АКЭ облученных ^{12}C : (а) средние относительные объемы опухоли в зависимости от дней после появления опухоли; (б) данные рисунка (а) представлены в виде количества дней для увеличения объема опухоли в 5 раз по сравнению с первым измеренным объемом. Объемы нормализованы к первому измеренному объему $\geq 0.40 \text{ см}^3$. Статистическая значимость от контрольной группы оценивалась с помощью U -критерия Манна – Уитни (* $p \leq 0.01$).

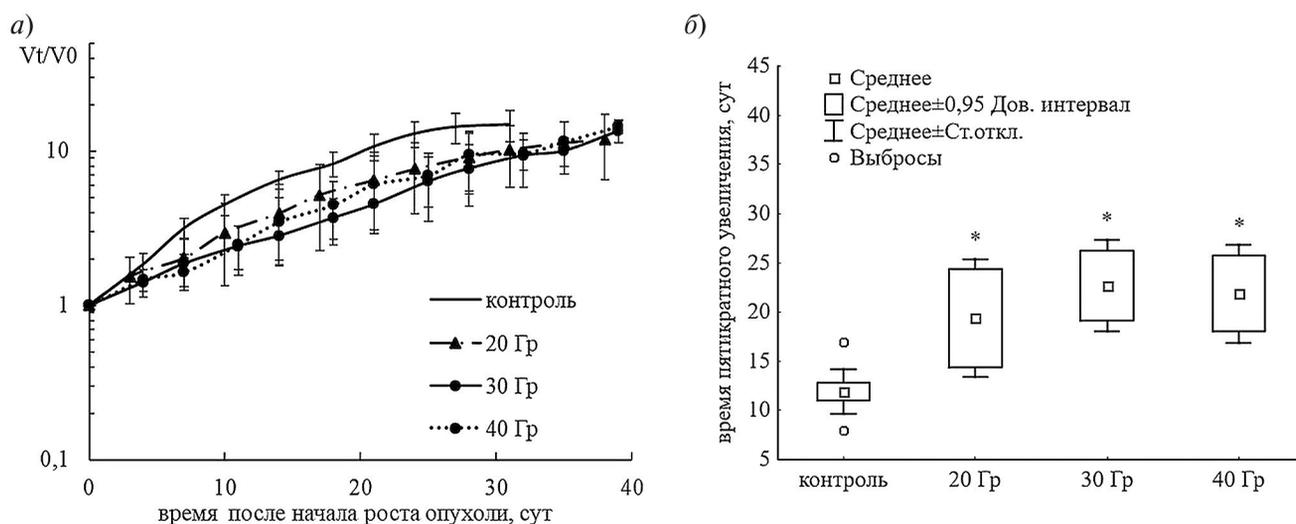


Рис. 3. Динамика роста опухолей у мышей после инокуляции суспензии клеток АКЭ облученных РИ: (а) средние относительные объемы опухоли в зависимости от дней после появления опухоли; (б) данные рисунка (а) представлены в виде количества дней для увеличения объема опухоли в пять раз по сравнению с первым измеренным объемом. Объемы нормализованы к первому измеренному объему $\geq 0.40 \text{ см}^3$. Статистическая значимость от контрольной группы оценивалась с помощью U -критерия Манна – Уитни (* $p \leq 0.01$).

(V_t/V_0). Скорость роста опухоли определяли по среднему времени 5-кратного увеличения опухоли, которое рассчитывалось как среднее количество дней от начала роста опухоли до объема опухоли, достигающего увеличения в 5 раз. Статистические расчеты проводились с помощью программы STATISTICA 10, различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.01$.

На рис. 1 представлена динамика появления опухолей у мышей после инокуляции клеток АКЭ,

облученных ^{12}C и РИ. На 5-е сут у 100% мышей, которым были инокулированы необлученные клетки, индуцировались солидные опухоли АКЭ. В группах, которым были инокулированы облученные *ex vivo* клетки, появление опухолей наблюдали с задержкой начала роста, которая зависела от величины дозы. При облучении клеток ^{12}C в дозе 5 Гр появление первых опухолей наблюдали на 8-е сут, 10 Гр – на 11-е сут, 20 Гр – на 21-е сут. После облучения опухолевых клеток РИ в дозе 20 Гр первые

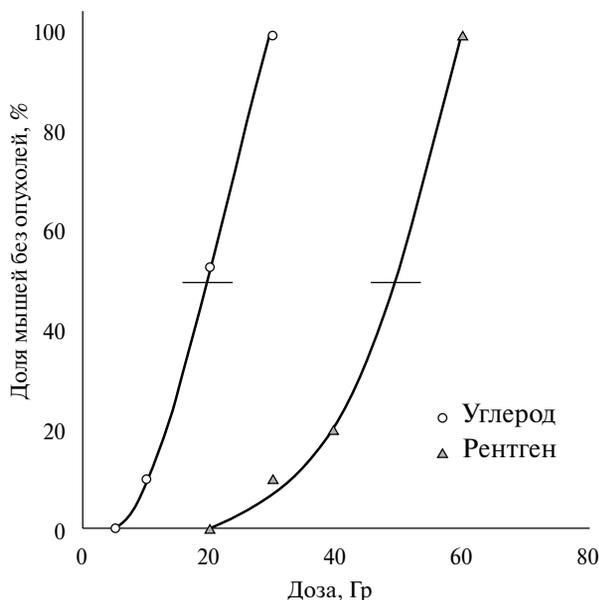


Рис. 4. Зависимость количества мышей без опухолей от дозы ^{12}C и РИ через 90 сут после инокуляции облученных клеток.

опухоли фиксировались на 11-е сут, 30 Гр — 14-е сут, 40 Гр — 18-е сут.

Через 30 сут частота индукции опухолей после облучения ^{12}C в дозах 5 Гр (88%) и 10 Гр (89%) не отличалась, в группе 20 Гр этот показатель снижился до 35%, а после облучения 30 Гр опухоли не появлялись (рис. 1а). Частота индукции опухолей после облучения клеток РИ в дозах 20; 30 и 40 Гр не отличалась и составляла 88; 70 и 80% соответственно, при этом у мышей, которым инокулировали клетки, облученные 60 Гр, опухоли в течение месяца не наблюдались (рис. 1б). Таким образом, если время появления первых опухолей зависело от дозы, то частота индукции опухолей в течение 1 мес при действии ^{12}C и РИ не зависела от величины дозы при более низких дозах исследуемого диапазона. Ранее нами при исследовании действия протонов на АКЭ *ex vivo* в дозах 30–150 Гр было показано, что частота индукции опухолей к концу первого месяца при более низких дозах также не зависела от дозы, в отличие от времени появления первых опухолей [11]. Можно предположить, что отсутствие зависимости частоты индукции опухолей от величины дозы на этом этапе развития опухолей свидетельствует о том, что на фоне гибели опухолевых клеток происходят стимулирование деления и дифференцировка ОСК, и эти закономерности зависят от свойств разных видов излучения [11].

При дальнейшем наблюдении до 90 сут было обнаружено, что после облучения ^{12}C в дозе 5 Гр у всех мышей появились опухоли, в дозе 10 Гр — у 90% животных, а при 20 Гр — у 47%. При облучении клеток АКЭ РИ в дозе 20 Гр на 90 сут 100% мышей были с

опухолями, в дозах 30 Гр и 40 Гр — 90 и 80% соответственно. После облучения суспензии АКЭ ^{12}C в дозе 30 Гр, а РИ в дозе 60 Гр опухоли у мышей не индуцировались в течение 90 сут. Следовательно, динамика появления опухолей после облучения клеток АКЭ *ex vivo* ^{12}C и РИ, как и через месяц после облучения, зависела от дозы. При этом эффективность ^{12}C относительно РИ была максимальной при более низких дозах, а затем уменьшалась.

Полученные данные позволили определить интервал времени, в течение которого появляются опухоли, а затем их количество не меняется. Интервал индукции опухолей после инокуляции клеток, облученных ^{12}C в дозе 5 Гр, составил 6–37 сут, 10 Гр — 9–27 сут, 20 Гр — 20–34 сут. При облучении клеток РИ в дозе 20 Гр это время составляло 11–49 сут, 30 Гр — 14–39 сут, а 40 Гр — 18–21 сут. Видно, что с ростом дозы интервал индукции АКЭ сокращался как для ^{12}C , так и для РИ. Медиана латентного периода при облучении ^{12}C в дозах 5 и 10 Гр составила 10 сут, а в дозе 20 Гр — 25 сут, при РИ медиана для 20 Гр равнялась 11 сут, 30 Гр — 17 сут, 40 Гр — 18 сут, что свидетельствует об увеличении латентного периода с ростом дозы для обоих типов излучений ($p \leq 0.01$). Эти закономерности несколько отличаются от действия высоких доз протонов на АКЭ *ex vivo*, где интервал индукции не зависел от дозы, а латентный период также увеличивался с ростом дозы [11].

На рис. 2 представлена динамика роста опухолей у мышей после инокуляции суспензии клеток АКЭ, облученных ^{12}C . Во всех группах, независимо от дозы, было обнаружено значительное торможение роста опухолей по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0.01$). Среднее время пятикратного увеличения объема опухоли при облучении ^{12}C составило 20.7 ± 4.5 сут, а у контроля 12.5 ± 3.5 сут.

На рис. 3 представлена динамика роста опухолей у мышей после инокуляции клеток АКЭ в зависимости от дозы РИ. Обнаружено, что скорость роста опухолей во всех группах достоверно ниже, чем в необлученном контроле ($p \leq 0.01$). Среднее время пятикратного увеличения объема опухоли при облучении РИ было близко к величине этого показателя, определенного для ^{12}C , и равнялось 22.7 ± 5.2 сут.

Таким образом, скорость роста АКЭ после облучения клеток *ex vivo* ^{12}C и РИ не зависела ни от дозы, ни от вида излучения, ни от времени начала роста солидной опухоли. В работе [14] при облучении ^{12}C ($E = 109.5 \text{ МэВ}$, ЛПЭ = 59 кэВ/мкм) в дозе 10 Гр и РИ (225 кВ) в дозах 20, 25 и 30 Гр саркомы мягких тканей у мышей скорость роста опухолей, облученных 10 Гр ^{12}C и 30 Гр РИ, также была одинаковой. Появление опухолей после инокуляции облучен-

ных асцитных клеток *ex vivo* в высоких дозах ^{12}C свидетельствует о высокой радиорезистентности, как мы предполагаем, ОСК. В исследовании [15] показано, что после облучения ^{12}C опухоли поджелудочной железы в дозе 25 Гр рост опухоли не наблюдался, в дозе 15 Гр у 80% мышей возобновлялся рост опухолей, тогда как при облучении РИ в дозе 60 Гр у 60% мышей опухоли росли. Авторы предполагают, что высокие дозы ^{12}C могут по сравнению с РИ более эффективно повреждать ОСК, расположенные в гипоксических областях опухоли в стадии G_0 , за счет индукции нерепарируемых кластерных повреждений ДНК независимо от стадий клеточного цикла и концентрации кислорода. Полученные нами результаты еще раз демонстрируют высокий туморогенный потенциал и радиорезистентность ОСК АКЭ, поскольку наблюдалась индукция опухолей у здоровых мышей после облучения опухолевых клеток в сублетальных и летальных дозах, величины которых, определенные по клеточной гибели и колониеобразующей способности при облучении ^{12}C *in vitro*, находятся в интервале 4–6 Гр [16].

На основе данных динамики индукции опухолей, были построены дозовые зависимости вероятности развития опухолей через 90 сут после инокуляции облученных клеток (рис. 4).

Доза, при которой у 50% мышей на 90 сут не будет опухолей, для ^{12}C составила 19.1 Гр, а для РИ – 49.4 Гр, что позволило определить по этому показателю величину ОБЭ для ^{12}C , равную 2.59. Это значение ОБЭ сопоставимо с полученным нами ранее по ЛД50/30 при облучении мышей этим же пучком ионов [12]. Наши данные также хорошо согласуются с результатами по определению ОБЭ на трех сублиниях клеток рака предстательной железы крыс, облученных ионами углерода ($E = 290$ МэВ, ЛПЭ = 75 кэВ/мкм) в дозах 17–37 Гр, где значение ОБЭ, определенное по 50%-ному появлению опухолей через 300 сут, составляло 1.62–2.30 [17]. При изучении радиочувствительности стволовых клеток глиомы ОБЭ для ^{12}C варьировалась от 1.87 до 3.44 в зависимости от условий [18]. В работе [19] по выживаемости клеток двух линий мезотелиомы человека после облучения в дозе 6 Гр ^{12}C ОБЭ составляло 2.82 и 2.93, а доля ОСК-подобных клеток увеличивалась через 10 дней после РИ, но не изменялась при облучении ^{12}C .

Таким образом, было обнаружено, что после облучения суспензии клеток АКЭ *ex vivo* ионами углерода в дозе 30 Гр и 60 Гр РИ солидные опухоли у мышей не появлялись в течение всего времени наблюдения. Показано, что динамика появления опухолей после облучения клеток АКЭ *ex vivo* ^{12}C и РИ зависела от дозы. Величина латентного периода, как при облучении клеток ^{12}C , так и РИ, увеличивалась с ростом дозы. Скорость роста опухолей по-

сле облучения клеток АКЭ *ex vivo* не зависела ни от дозы, ни от вида излучения, но значительно отличалась от контроля. Величина ОБЭ, определенная по равноэффективной дозе вероятности индукции опухолей у 50% мышей в течение 90 сут, составила 2.59, что свидетельствует о высокой противоопухолевой эффективности исследуемого пучка ионов углерода.

Ранее нами при разработке биомедицинских моделей и способов повышения эффективности высокоэнергетических протонов было показано, что после облучения асцитных клеток высокими дозами в условиях *ex vivo* и *in vivo* динамика индукции и рост опухолей не зависят от условий облучения [11]. Облучение опухолевых клеток не только *ex vivo* с последующей инокуляцией животным является удобным, результативным и экономичным подходом к изучению разных по радиочувствительности форм опухолей (асцитной и солидной), зависимости радиочувствительности от количества клеток, содержания кислорода в суспензии, но и позволяет быстрее проводить скрининг химических и физических способов модификации ионного излучения, использовать методы генной инженерии для повышения противоопухолевой эффективности, поскольку не требует транспортировки животных, сложного позиционирования при локальном облучении на ускорителях, упрощает контроль дозы и ее равномерного распределения. Мы предполагаем, что поскольку регистрируемые в нашей работе показатели опухолевого роста являются интегральным результатом гибели, задержки деления разных по радиочувствительности клеток опухоли, стимулирования дифференцировки и пролиферации ОСК в условиях влияния микроокружения опухоли и естественного противоопухолевого иммунитета организма, то предложенная экспериментальная модель может послужить полезным инструментом для исследования проблем радиорезистентности и рецидивирования опухолей и дальнейшего исследования потенциала ионной терапии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам Лаборатории ионного лучевого комплекса НИЦ “Курчатовский институт” Пикалову В. А. и Васильевой А. Г. за помощь в организации и проведении экспериментов на оборудовании “Радиобиологического стенда на углеродном пучке У-70”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 075-01025-23-01 Федерального государственного бюджетного учреждения науки – Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук и при частичном финансировании из средств договора НИР № 28/22 между Филиалом “Физико-технический центр” Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физического института им. П.Н. Лебедева Российской академии наук и Федеральным государственным бюджетным учреждением науки – Институтом теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>). Протоколы с использованием животных были одобрены комиссией ИТЭБ РАН по биологической безопасности и биоэтике (№ 11/2023 от 08.02.2023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yamada S., Takiyama H., Isozaki Y., et al. Carbon-ion Radiotherapy for Colorectal Cancer // *J. Anus. Rectum Colon*. 2021. V. 5. № 2. P. 113–120.
2. Malouff T.D., Mahajan A., Krishnan S., et al. Carbon Ion Therapy: A Modern Review of an Emerging Technology // *Front. Oncol*. 2020. V. 10:82.
3. Durante M., Debus J., Loeffler J.S. Physics and biomedical challenges of cancer therapy with accelerated heavy ions // *Nat. Rev. Phys*. 2021. Vol. 3. № 12. P. 777–790.
4. Desouky O., Zhou G. Biophysical and radiobiological aspects of heavy charged particles // *Journal of Taibah University for Science*. 2015. Vol. 10. P. 187–194.
5. Saager M., Glowa C., Peschke P., et al. Split dose carbon ion irradiation of the rat spinal cord: Dependence of the relative biological effectiveness on dose and linear energy transfer // *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2015. Vol. 117. P. 358–363.
6. Elsasser T., Weyrather W.K., Friedrich T., et al. Quantification of the relative biological effectiveness for ion beam radiotherapy: direct experimental comparison of proton and carbon ion beams and a novel approach for treatment planning // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*. 2010. Vol. 78. P. 1177–1183.
7. Batlle E., Clevers H. Cancer stem cells revisited // *Nat. Med*. 2017. Vol. 23. P. 1124–1134.
8. Dzobo K., Senthilane D.A., Ganz C., et al. Advances in therapeutic targeting of cancer stem cells within the tumor microenvironment: an updated review // *Cells*. 2020. Vol. 9, № 8.
9. Chang L., Graham P., Hao J., et al. Cancer stem cells and signaling pathways in radioresistance // *Oncotarget*. 2016. Vol. 7. № 10. P. 11002–11017.
10. Mishra S., Tamta A.K., Sarikhani M., et al. Subcutaneous Ehrlich ascites carcinoma mice model for studying cancer-induced cardiomyopathy // *Scientific reports*. 2018. Vol. 8. № 1. Published 2018 Apr 4.
11. Balakin V.E., Rozanova O.M., Smirnova E.N., et al. Growth induction of solid Ehrlich ascitic carcinoma in mice after proton irradiation of tumor cells *ex vivo* // *Doklady Biochemistry and biophysics*. 2023. Vol. 511. № 1. P. 151–155.
12. Заичкина С.И., Розанова О.М., Смирнова Е.Н. и др. Оценка биологической эффективности ускоренных ионов углерода с энергией 450 МэВ/нуклон в ускорительном комплексе У-70 по критерию выживаемости мышей // *Биофизика*. 2019. Т. 64. № 6, С. 1208–1215.
13. Koch R.A., Boucsein M., Brons S., et al. A time-resolved clonogenic assay for improved cell survival and RBE measurements // *Clinical and translational radiation oncology*. 2023. Vol. 42.
14. Brownstein J.M., Wisdom A.J., Castle K.D., et al. Characterizing the potency and impact of carbon ion therapy in a primary mouse model of soft tissue sarcoma // *Mol. Cancer Ther*. 2018. Vol. 17. № 4. P. 858–868.
15. Sai S., Wakai T., Vares G., et al. Combination of carbon ion beam and gemcitabine causes irreparable DNA damage and death of radioresistant pancreatic cancer stem-like cells in vitro and in vivo // *Oncotarget*. 2015. Vol. 6. № 8. P. 5517–5535.
16. Комарова Л.Н., Мельникова А.А., Балдов Д.А. Синергические эффекты комбинированного действия ионов углерода и химиопрепарата доксорубицин на раковых клетках линии HeLa // *Известия высших учебных заведений. Ядерная энергетика*. 2021. № 3, С. 158–168.
17. Glowa C., Karger C.P., Brons S., et al. Carbon ion radiotherapy decreases the impact of tumor heterogeneity on radiation response in experimental prostate tumors // *Cancer Letters*. 2016. Vol. 378. № 2. P. 97–103.
18. Chiblak S., Tang Z., Campos B., et al. Radiosensitivity of patient-derived glioma stem Cell 3-dimensional cultures to photon, proton, and carbon irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*. 2016. Vol. 95. № 1. P. 112–119.
19. Sai S., Suzuki M., Kim E.H., et al. Effects of carbon ion beam alone or in combination with cisplatin on malignant mesothelioma cells in vitro // *Oncotarget*. 2017. Vol. 9. № 19. P. 14849–14861.

ANTI-TUMOR EFFECT OF HIGH DOSES OF CARBON IONS AND X-RAYS DURING IRRADIATION OF EHRLICH ASCITES CARCINOMA CELLS EX VIVO

**Corresponding Member of the RAS V. E. Balakin^a, T. A. Belyakova^{a, #}, O. M. Rozanova^b,
E. N. Smirnova^b, N. S. Strelnikova^a, E. A. Kuznetsova^b**

^a Branch "Physical-Technical Center" of P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy
of Sciences, Protvino, Russian Federation

^b Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Russian Federation

[#]E-mail: belyakovata@lebedev.ru

The effect of carbon ions (^{12}C) with the energy of 400 MeV/nucleon on the dynamics of induction and growth rate of solid tumors in mice under irradiation of Ehrlich's ascites carcinoma cells (EAC) ex vivo at doses of 5–30 Gy relative to the action of equally effective doses of X-ray radiation was studied. The dynamics of tumor induction under the action of ^{12}C and X-rays had a similar character and depended on the dose during 3 months of observation. The value of the latent period, both when irradiating cells with ^{12}C and X-ray, increased with increasing dose, and the interval for tumor induction decreased. The rate of tumor growth after ex vivo irradiation of EAC cells was independent of either dose or type of radiation. The dose at which EAC tumors are not induced within 90 days was 30 Gy for carbon ions and 60 Gy for X-rays. The value of the relative biological effectiveness of carbon ions, calculated from an equally effective dose of 50% probability of tumors, was 2.59.

Keywords: Ehrlich ascites carcinoma, ex vivo, carbon ion, X-ray, RBE, mice.

УДК 612.133/.179+532.5.031

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ И МОДЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАКРУЧЕННОГО ТЕЧЕНИЯ ЖИДКОСТИ В СХОДЯЩЕМСЯ КАНАЛЕ В КАЧЕСТВЕ МОДЕЛИ ДВИЖЕНИЯ КРОВИ В СЕРДЦЕ И АОРТЕ

© 2024 г. Я. Е. Жарков, Ш. Т. Жоржолиани, А. А. Сергеев, А. В. Агафонов, А. Ю. Городков*, академик РАН Л. А. Бокерия

Поступило 10.12.2023 г.

После доработки 15.01.2024 г.

Принято к публикации 17.01.2024 г.

Проведено исследование закрученных потоков в каналах, соответствующих статической аппроксимации проточных каналов сердца и магистральных сосудов, имеющих продольно-радиальный профиль $zR^2 = \text{const}$ и вогнутую обтекаемую поверхность в начале продольной координаты. Проведен сравнительный анализ структуры течения в конфигурациях каналов $zRN = \text{const}$, где $N = -1, 1, 2, 3$ в отсутствие и при наличии вогнутой поверхности. Численное моделирование сопоставляли с результатами гидродинамических экспериментов по расходным характеристикам и форме линий тока. Численную модель использовали для определения структуры скоростей, потерь на вязкое трение и сдвиговых напряжений. Численное моделирование течений в стационарном режиме для каналов без вогнутой поверхности показало, что в канале $zR^2 = \text{const}$ возникает устойчивая вихревая структура течения при наименьших потерях на вязкое трение. Наличие вогнутой поверхности достаточного размера существенно уменьшает потери на вязкое трение и сдвиговые напряжения в стационарном и пульсирующем режимах.

Ключевые слова: вихревые потоки, форма проточного канала, аппроксимация формы сердца и сосудов, закрученное течение крови, потери на вязкое трение, сдвиговые напряжения.

DOI: 10.31857/S2686738924020191, EDN: WEAKAL

ВВЕДЕНИЕ

Многими экспериментальными и клиническими наблюдениями доказано, что в норме поток крови в сердечно-сосудистой системе является закрученным в центральных отделах системы кровообращения – сердце и магистральных сосудах. Это обусловлено особенностями динамической геометрической конфигурации проточного канала сердца, динамикой сердечного сокращения и особыми упруго-деформационными свойствами сосудов, принимающих сердечный выброс [1, 2]. В ранее опубликованных работах [3–7] также было отмечено, что в левых отделах закрученная структура потока крови поддерживается в течение всего сердечного цикла в каждом сегменте от левого предсердия до конца аорты.

Тем не менее физиологическая роль закрученного течения в настоящее время остается не-

выясненной. Помимо этого, интерес также представляет влияние характера течения на состояние и функции клеточных и белковых компонентов крови и стенок проточных каналов, включая роль закрутки потока в регуляторных и компенсаторных процессах.

Определение физиологической роли закрученных течений в отделах сердца посредством прямых клинических исследований является сложной задачей в связи с ограниченной доступностью и недостаточной точностью методов измерений. Целесообразным является изучение потоков посредством использования физических и численных моделей, при которых возможно проведение анализа внутренней структуры формируемых течений. Тем не менее моделирование в условиях динамически изменяемой геометрии сопряжено с трудностями при физическом моделировании, так как неясны критерии подобия физической модели и реальной системы кровообращения. Принимая во внимание вышесказанное, моделирование требует наличия достоверной статической аппроксимации мгновенной динамической конфигурации проточного канала сердца и сосудов.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева» МЗ РФ

*E-mail: agorodkov@bk.ru

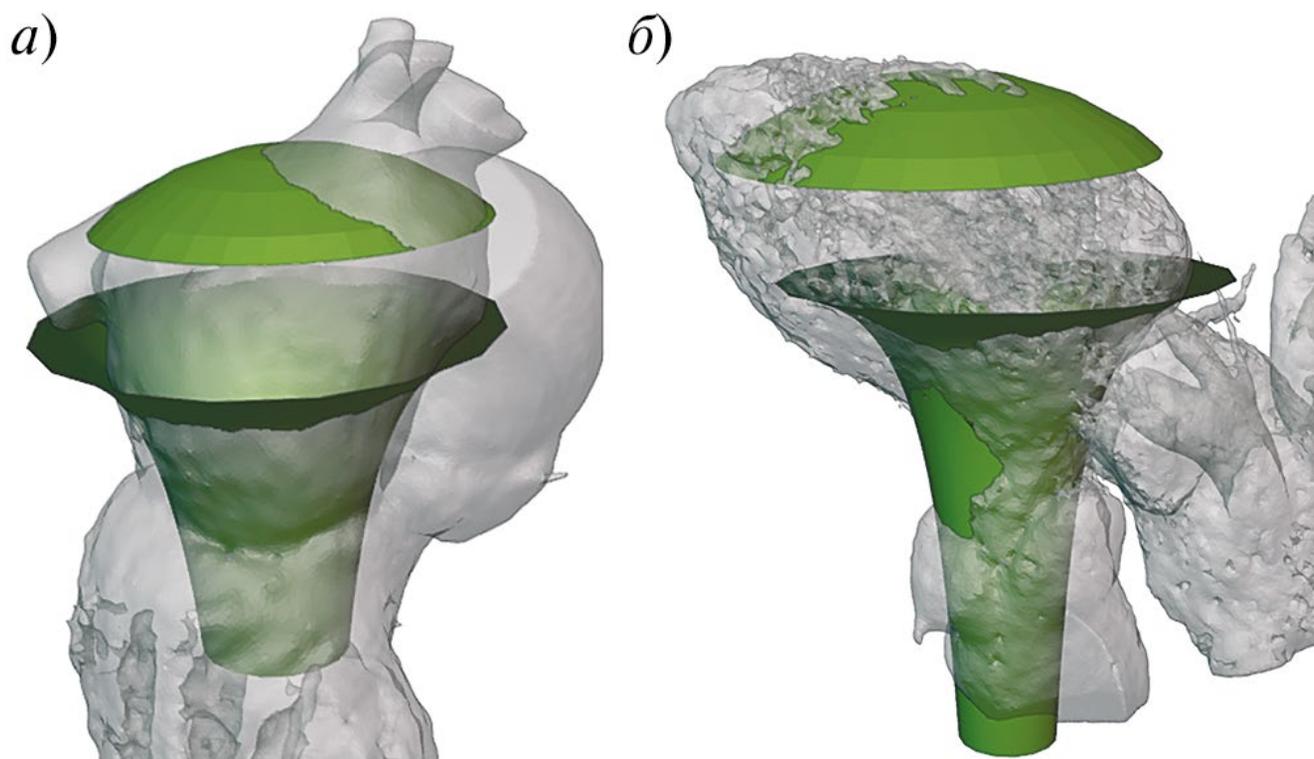


Рис. 1. Геометрическая аппроксимация формы левого предсердия (а) и левого желудочка (б) посредством канала статической формы с продольно-радиальным профилем $zR^2 = \text{const}$ с вогнутой поверхностью.

Существование закрученного характера течения экспериментально было доказано на основании анализа геометрической конфигурации полостей левого предсердия, левого желудочка и аорты по данным компьютерной томографии. По результатам экспериментальных исследований показано, что каждая из этих полостей в момент перемещения струи с достаточной точностью может быть аппроксимирована посредством двух поверхностей, соответствующих каналу сердечного отдела и вогнутой поверхности, вдоль которой кровь поступает в соответствующую полость.

На основании ранее опубликованных решений уравнений Навье – Стокса и неразрывности [8] для аппроксимации канала использована поверхность, продольно-радиальный профиль которой соответствует выражению

$$zr^2 = \text{const},$$

где z и r – продольная и радиальная координаты.

Помимо этого известно, что при обтекании поверхности с нанесенным рельефом в виде углублений – лунок в них формируются встроенные закрученные струи, по структуре соответствующие вихрям Бюргерса [9]. По аналогии с этим явлением можно предположить, что в основании закрученной струи, формируемой в камерах сердца, присутствует вогнутая поверхность, подобная

лунке. Так, для левого предсердия эта поверхность соответствует куполу левого предсердия, а для левого желудочка эта поверхность соответствует свободной стенке. Форма этой вогнутой поверхности была определена аналитически [10], однако она может быть с определенными допущениями аппроксимирована половиной двуполостного гиперболоида.

Целью настоящей работы является анализ структуры течений, формируемых в статической геометрии, с применением рассмотренных аппроксимаций для выявления положительных эффектов, сопутствующих наличию закрученного течения и оказывающих влияние на состояние потока в центральных отделах системы кровообращения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Как было ранее сказано, прямые исследования потока крови в сердечно-сосудистой системе представляют значительные трудности из-за сложности системы, множества взаимосвязанных параметров и механизмов их регуляции. Поэтому выбранным подходом к исследованию явилось изучение закрученных течений в конфузорных каналах различной геометрической конфигурации с помощью физического и численного моделирования.

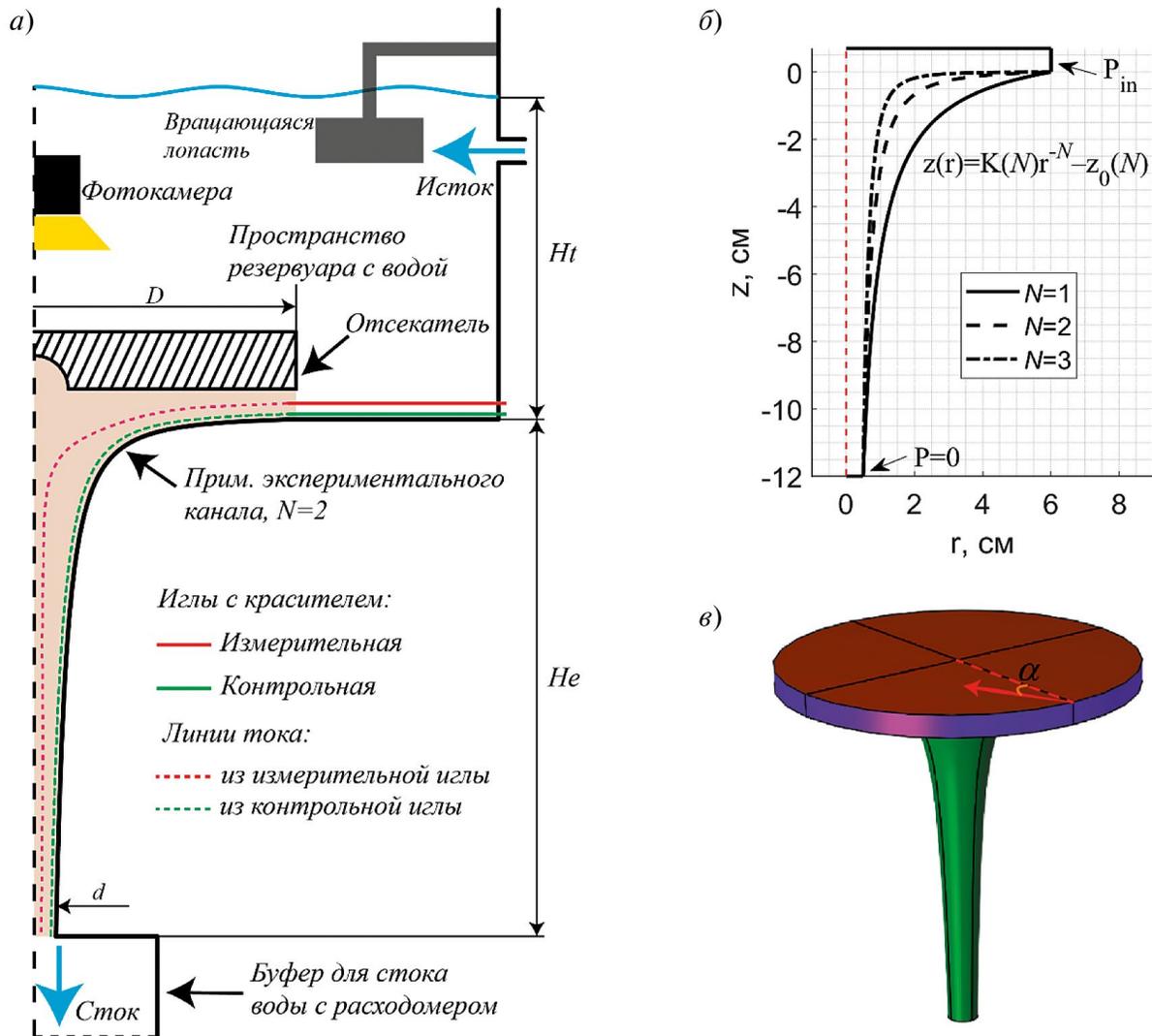


Рис. 2. Схема экспериментальной установки (а) и геометрическая конфигурация численной модели (б, в): а) H_t – высота столба воды в резервуаре с водой, H_e – высота канала, D – диаметр отсекаателя, d – диаметр выходного отверстия канала; б) P_{in} – задаваемое статическое давление на входе в канал; в) α – угол скорости жидкости по отношению к нормали поверхности истока. Физическое моделирование для различных геометрических конфигураций канала проводили в воде, перепад давления в канале создавали с помощью столба воды в резервуаре, закрутку жидкости организовывали посредством вращающейся лопасти. Регистрацию расхода проводили на выходе экспериментального канала, линии тока визуализировали посредством введения красителя в канал с применением двух игл: измерительной и контрольной. На рис. 2 б, в показано, что численное моделирование проводили в условиях, идентичных экспериментальным. Граничное условие статического давления на входе в канал изменяли в зависимости от требований моделирования. Создание азимутальной составляющей скорости жидкости осуществляли посредством параметризации угла α между вектором скорости на входе канала к нормали входной поверхности.

Несмотря на то что исследование закрученных течений с применением численного моделирования является достаточно распространенным [11–15], его использование требует корректного выбора типа численной модели, который, в свою очередь, зависит от нюансов геометрии, свойств среды и характерных скоростей течения. Помимо этого, корректность выбора типа модели требует обязательной валидации результатов численного моделирования с результатами физического эксперимента.

На основании экспериментальных исследований проточных каналов сердца и исследований динамических объемных изображений, полученных с помощью томографии, аппроксимация формы канала поверхностью с профилем $zR^2 = \text{const}$ оказалась наиболее близкой к действительной. Поэтому при физическом моделировании закрученного потока жидкости было проведено сравнение данной формы канала с каналами, соответствующими профилям $zR^N = \text{const}$, где $N = -1; 1$ и 3 . Помимо исследования формы профиля канала также про-

водилось исследование влияния формы и размеров обтекаемой вогнутой поверхности в начале закрученной струи на характер течения при физическом и численном моделировании (рис. 1)

1. *Экспериментальная установка.* Схематическое изображение установки для физического моделирования течения приведено на рис. 2а. Она состоит из подающего и принимающего резервуаров, между которыми установлен экспериментальный канал высотой 120 мм, ограниченный от основного объема жидкости в подающем резервуаре отсекателем, имеющим плоскую или вогнутую поверхность. Зазор между устьем канала и отсекателем составлял 8 мм (рис. 2в).

В качестве рабочей среды системы использовали воду. Голубыми стрелками отражены направления потока жидкости. Модели каналов были изготовлены из акрилового стекла, позволяющего производить видеорегистрацию формы линий тока внутри канала.

Для этого в область щели между краем отсекателя и началом канала на заданной высоте (от 1 до 7 мм) устанавливали 2 иглы с малым диаметром выходного отверстия (~1 мм), через которые подавали краситель с плотностью, равной плотности воды. Одну иглу (контрольная) устанавливали на одной и той же высоте (4 мм), положение второй иглы (измерительной) изменяли от 1 до 7 мм. Скорость истечения красителя подбирали так, чтобы избежать размывания. Регистрацию линий тока производили посредством камеры, расположенной над отсекателем.

Закрученное течение в пространстве исследуемой системы создавали посредством вращения лопасти большой площади в пространстве резервуара. Скорость вращения лопасти выбирали таким образом, чтобы угол суммарного вектора скорости по отношению к поверхности щели составлял ~30° (по данным визуализации).

В эксперименте исследовали следующие варианты каналов:

1) конический канал с острой кромкой и углом конуса 30°;

Таблица 1. Значения чисел Рейнольдса для различных геометрий экспериментальных систем

Форма экспериментальной системы	Значение в зоне края отсекателя (щели)	Значение на выходе
Конус	1226	$24.8 \cdot 10^3$
$zR = \text{const}$	1327 ± 36	$(26.5 \pm 0.2) \cdot 10^3$
$zR^2 = \text{const}$		
$zR^3 = \text{const}$		

2) три конфузорных канала, соответствующих условиям $zR^N = \text{const}$, где показатель степени N был равен 1; 2 и 3 соответственно;

3) два варианта обтекаемой поверхности отсекателя: плоская и вогнутая.

Используемые методы регистрации (видеорегистрация линий тока, регистрация расхода) не позволяют оценить пространственные распределения большого количества интересующих параметров, таких как сдвиговые напряжения, поле скоростей и давлений, потери на вязкое трение. Для определения данных параметров была использована численная модель.

2. *Численная модель.* Для моделирования статических и динамических течений в программе Comsol Multiphysics была разработана численная модель, схематическое изображение которой приведено на рис. 2б, в.

Согласно приведенному изображению, геометрия канала в аксиально-симметричной системе координат состояла из боковой криволинейной поверхности с высотой, равной 12 см, и описываемой выражением

$$Z(R) = \frac{K(N)}{R^N} - z_0(N)$$

где N – показатель степени; $K(N)$ и $Z_0(N)$ – константы системы, зависящие от показателя степени, нижней и верхней частей системы с диаметрами

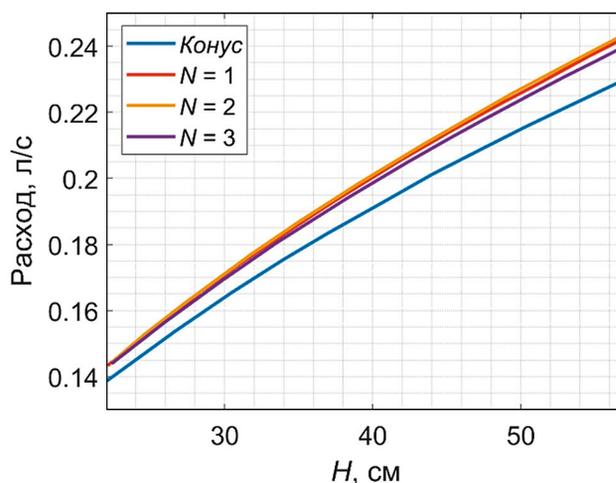


Рис. 3. Зависимость расходных характеристик от высоты столба жидкости в резервуаре для каналов различной формы: Конус – зависимость расхода для канала конической формы. $N = 1, 2, 3$ – зависимость расхода для каналов $zR^N = \text{const}$ с указанным показателем степени. Видно, что расходные характеристики для каналов $zR^N = \text{const}$ имеют малое отличие. Расходные характеристики канала конической формы ниже на 4%.

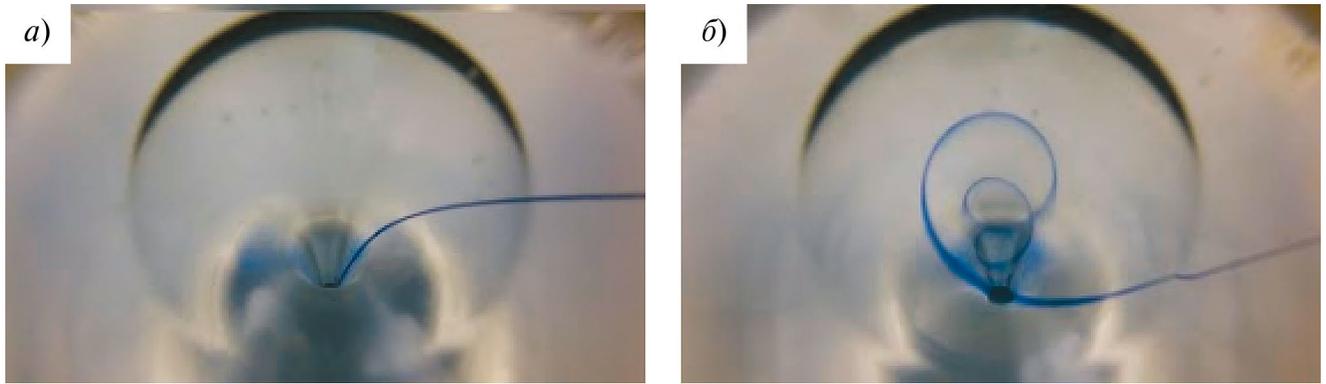


Рис. 4. Фотографии линий тока в отсутствие (а) и при наличии (б) закрутки для канала $zR^2 = \text{const}$. Видно, что в отсутствии азимутальной составляющей скорости течения форма линии тока жидкости повторяет форму канала, в то время как при ее наличии форма имеет вид сходящейся спирали.

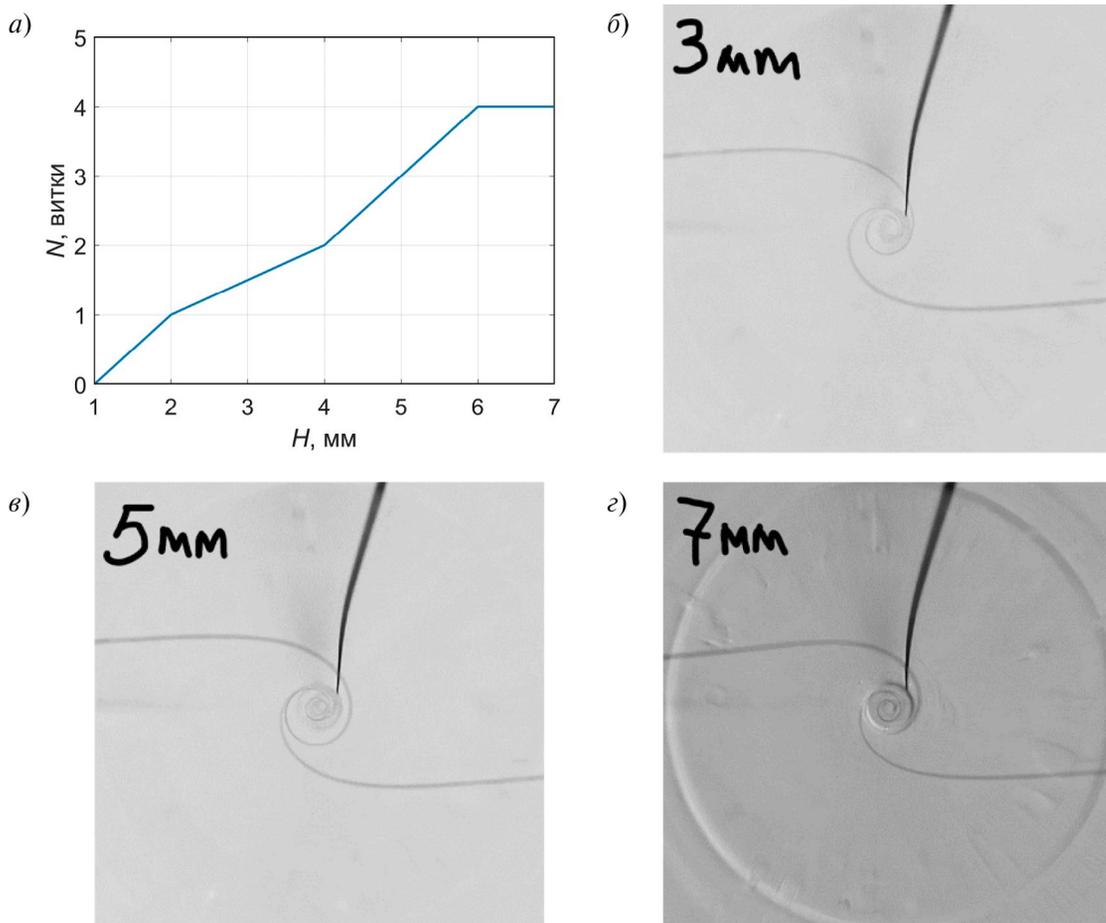


Рис. 5. Экспериментальная зависимость количества витков линии от высоты подъема измерительной иглы в щели канала (а) и фотографии линий тока при положении камеры над каналом (б-г): Контрольная игла расположена справа, измерительная игла – слева; струя красителя сверху визуализирует границу канала. Из рис. 5 видно, что количество витков спиральной линии тока нарастает при увеличении высоты подъема измерительной иглы. По рис. 5г видно, что визуальное отслеживание количества витков в крайнем положении измерительной иглы затруднено.

1 и 12 см соответственно, входной щели, высота которой составляет 8 мм.

Для проведения численного моделирования в программе Comsol Multiphysics с целью определения пространственного распределения параметров (давлений, скоростей, завихренностей, сдвиговых напряжений) использовали модуль “Вычислительная гидродинамика” (CFD: SPF) с использованием модели турбулентности $k-\omega$ [16–17].

Граничные условия включали стационарные давления на входе и выходе в канал (рис. 2, б), а также условие проскальзывания жидкости вблизи поверхности стенок. Для задания граничных условий использовали стандартные средства программы Comsol Multiphysics для случая модели $k-\omega$.

В качестве граничного условия течения жидкости вблизи поверхности стенок канала использовалось граничное условие Automatic Wall Treatment, являющегося выбором по умолчанию при использовании модели $k-\omega$ в программе Comsol Multiphysics. Данное граничное условие является гибким способом описания течения вблизи поверхности стенки при различном качестве детализации конечно-элементной сетки. В случае наличия детальной сетки граничное условие Automatic Wall Treatment позволяет получить точное описание течения с малым числом Рейнольдса вблизи поверхности, в то время как при более грубых дискретизациях для численного решения используется комбинация линейного и логарифмического подслоев.

Для визуализации линий тока в программе Comsol Multiphysics для рассматриваемой геометрии применяли модуль “Particle Tracing For Fluid Flow” (FTR). Расчет линий тока проводили в два этапа:

- 1) на первом этапе производили расчет полей давления и скоростей в стационарном режиме;
- 2) на втором этапе расчета, используя данные стационарного распределения параметров, производили динамический расчет траекторий движения

частиц с применением FTR. Линии тока течения определяли как совокупность точек траекторий движения частиц, от щели вдоль канала (рис. 2в). Учет вязких взаимодействий в потоке производили в соответствии с законом Стокса.

Для валидации численной модели использовали форму и длину линии тока в физическом и численном экспериментах совместно с расходными характеристиками потока через исследованные каналы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ФИЗИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Для определения преимуществ закрученных течений физическое моделирование проводили для всех комбинаций перечисленных параметров:

- отсутствие/наличие закрутки в накопительном резервуаре;
- высота жидкости в резервуаре;
- геометрия экспериментального конфузора.

Несмотря на различия в геометрии каналов, экспериментальные условия на входе и выходе были одинаковы (табл. 1).

Расходные характеристики потока определяли по времени истечения равного объема жидкости под действие силы тяжести в режиме свободной струи, т.е. сток воды происходил в воздушную среду. Для регистрации формы линий тока к выходной части канала подсоединяли резервуар, заполненный водой, меняя режим истечения со свободной струи на затопленную струю.

По результатам регистрации расходных характеристик было получено, что факт наличия азимутальной составляющей скорости жидкости не влияет на время истечения равного объема жидкости для всех исследованных каналов. Скорость истечения равного объема жидкости через каналы формы $zR^N = \text{const}$ достоверно выше на 4%, чем аналогичная скорость в канале с формой конуса на всем диапазоне давлений (рис. 3).

Для каждого из экспериментов регистрировали форму линий тока при различных высотах расположения игл с контрастом.

Визуализация линий тока течения жидкости в отсутствие закрутки показала, что жидкость движется по кратчайшему пути в сторону выходного отверстия канала (рис. 4а), а при наличии закрутки линии тока во всех каналах (включая конический) представляют собой осесимметричную сходящуюся спираль (см. рис. 4б), т.е. траектория движения каждого элемента жидкости существенно удлиняется.

По результатам экспериментальных исследований получено, что количество витков спиральной

Таблица 2. Расходные характеристики при физическом и численном моделировании

Форма экспериментальной системы	Расход, л/с	
	Численная модель	Физическая модель
Конус	0.207	0.204
$zR = \text{const}$	0.215	0.214
$zR^2 = \text{const}$	0.215	0.214
$zR^3 = \text{const}$	0.212	0.212

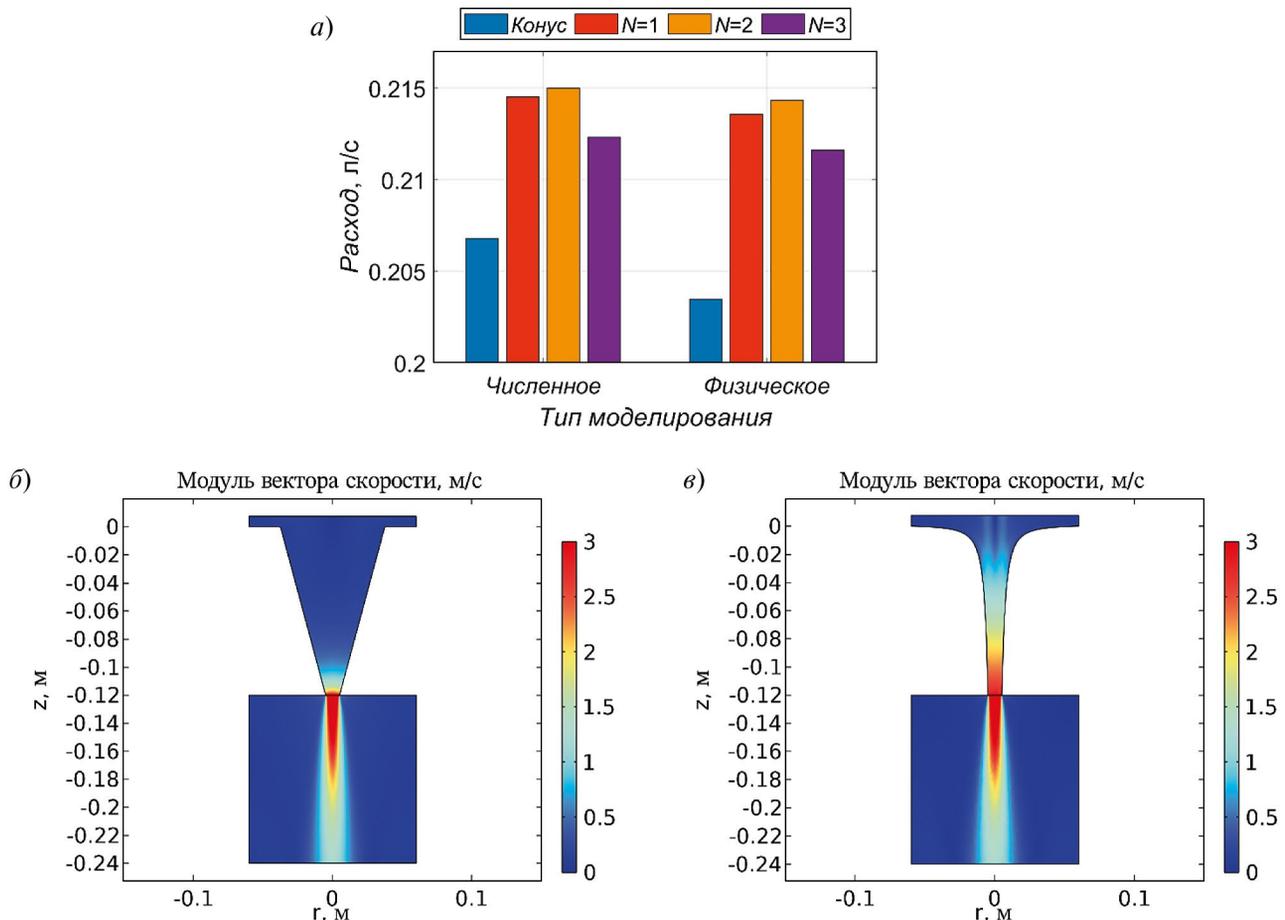


Рис. 6. Расходные характеристики при численном и физическом моделировании для разных форм канала (а), структура скоростей течения для каналов конической формы (б) и формы $zR^N = \text{const}$ (в): Cone – зависимость расхода для канала конической формы. $N = 1, 2, 3$ – зависимость расхода для каналов $zR^N = \text{const}$ с указанным показателем степени. Видно, что расходные характеристики имеют хорошее совпадение. По рис. бб, в видно, что уменьшение расхода для каналов $zR^N = \text{const}$ связано с высоким гидродинамическим сопротивлением в зоне максимального сужения канала.

линии тока зависит от высоты подъема измерительной иглы (рис. 5), но не зависит ни от показателя степени функции $zR^N = \text{const}$, ни от наличия вогнутой поверхности.

Из представленных результатов физического моделирования не представляется возможным определить положительные эффекты, возникающих вследствие наличия закрученного течения, как и проведение детального анализа структуры течения. Для более детального анализа особенностей течения жидкости в рассматриваемых каналах были использованы методы численного моделирования.

Как ранее было указано, моделирование закрученных потоков требует обязательной валидации с результатами физического эксперимента, поэтому важно сформулировать однозначные признаки подобия модельного течения и реального потока. В качестве таких признаков в нашем исследовании

были выбраны длина и количество витков спиральной линии тока закрученного течения, а также расходные характеристики для каналов различной геометрической конфигурации.

В результате численного моделирования предполагалось выявить характерные отличия течений в каналах формы $zR^N = \text{const}$ с разным показателем степени ($N = 1; 2; 3$), а также выявить влияния вогнутой поверхности на характер течения и его характеристики.

ВАЛИДАЦИЯ ЧИСЛЕННОЙ МОДЕЛИ

Для валидации численной модели было произведено сравнение расходных характеристик, полученных в ходе численного и физического экспериментов, и определены формы линий токов.

Для валидации численной модели по параметру расходных характеристик численная модель

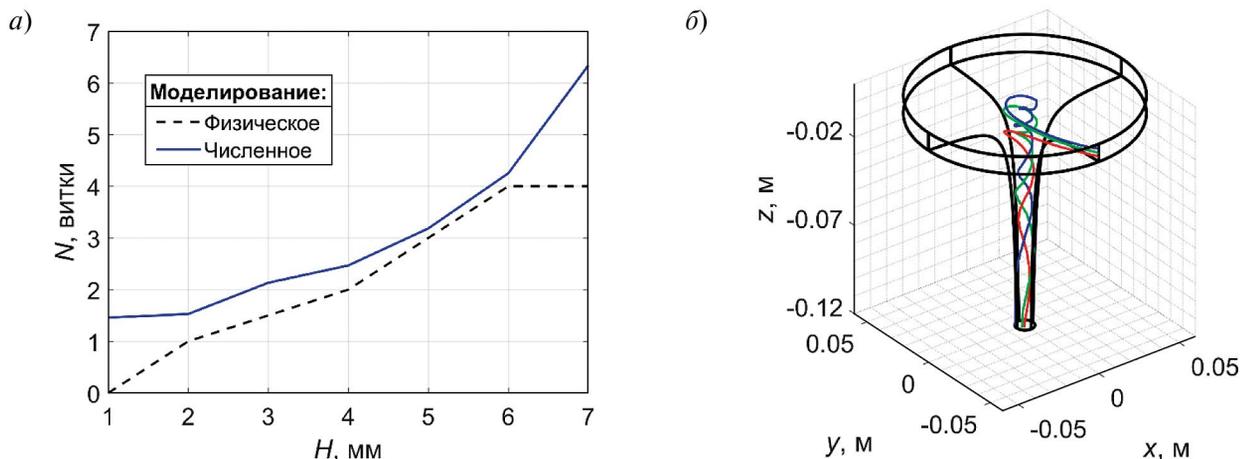


Рис. 7. Зависимости числа витков линии тока от высоты подъема иглы при физическом и численном экспериментах (а), трехмерная визуализация численно определенных линий тока для высот 3, 5 и 7 мм (б). Видно, что количество витков спиральных линий тока при численном и физическом моделировании имеют удовлетворительное совпадение.

должна быть эквивалентна физической. Так как в физическом эксперименте регистрацию расхода производили в режиме свободной струи, то численное моделирование необходимо проводить с учетом ее наличия, что, в свою очередь, ставит задачу моделирования течения двух типов сред. Тем не менее моделирование такого рода течений является избыточно ресурсоемким для целей определения расходных характеристик в настоящей задаче. В связи с этим численное моделирование проводилось для режима затопленной струи (рис. 5б, в), так как наличие воздуха в исследуемой геометрической конфигурации каналов не должно влиять на расходные характеристики при наличии вращающегося потока. Моделирование проводили при статическом давлении на входе в систему, равном 4.4 кПа (45 см водного столба), при угле $\alpha = 30^\circ$ для всех геометрических конфигураций каналов.

Расчетные результаты и результаты, зарегистрированные в физическом эксперименте, приведены в табл. 2. Согласно представленным результатам численное моделирование при описанных допущениях с достаточной точностью воспроизводит зарегистрированное различие между коническим каналом и каналами $zR^N = \text{const}$, составляющее в среднем 4.5%. Отличие между каналами $zR^N = \text{const}$ составляет менее 1.3%, что входит в диапазон погрешностей измерений физического эксперимента, хотя качественно это различие видно из графика на рис. 3.

Полученное совпадение расходных характеристик в численном и физическом моделировании свидетельствует о корректном воспроизведении в модели характера течения в рассматриваемых геометрических конфигурациях каналов.

Результаты также показывают разницу в форме структуры течения в каналах различной формы (рис. 6б, в). Во всех каналах скорость увеличивается с уменьшением радиуса. В случае конуса изменение площади сечения канала с убыванием высоты пропорционально квадрату продольной координаты z , а в случаях каналов с формой $zR^N = \text{const}$, уменьшение сечения происходит в соответствие с показателями степени N от -2 до $-2/3$. Это приводит к более быстрому возрастанию скорости вдоль каналов данной формы по сравнению с коническим каналом даже без учета закрученного характера потока.

Расходные характеристики являются интегральным параметром оценки течения, не отражающим его внутреннюю структуру. Поэтому вторым критерием для валидации численной модели являлось совпадение количество витков спирали линий тока, полученных в физическом эксперименте и при численном моделировании при равенстве давлений.

Результаты, полученные посредством расчета и зарегистрированные в ходе эксперимента, имеют удовлетворительное совпадение (рис. 7). Количество витков спиральной линии тока совпадает при положении измерительной иглы щели на высоте от 2 до 6 мм, что соответствует различному положению линии тока по радиусу струи. В крайних положениях (1 и 7 мм) отличие расчетных и экспериментальных результатов объясняется близостью стенок канала и сложностью визуальной интерпретации экспериментальных данных.

Таким образом, качественное совпадение формы линий тока и расходных характеристик в результате физического и численного моделирования

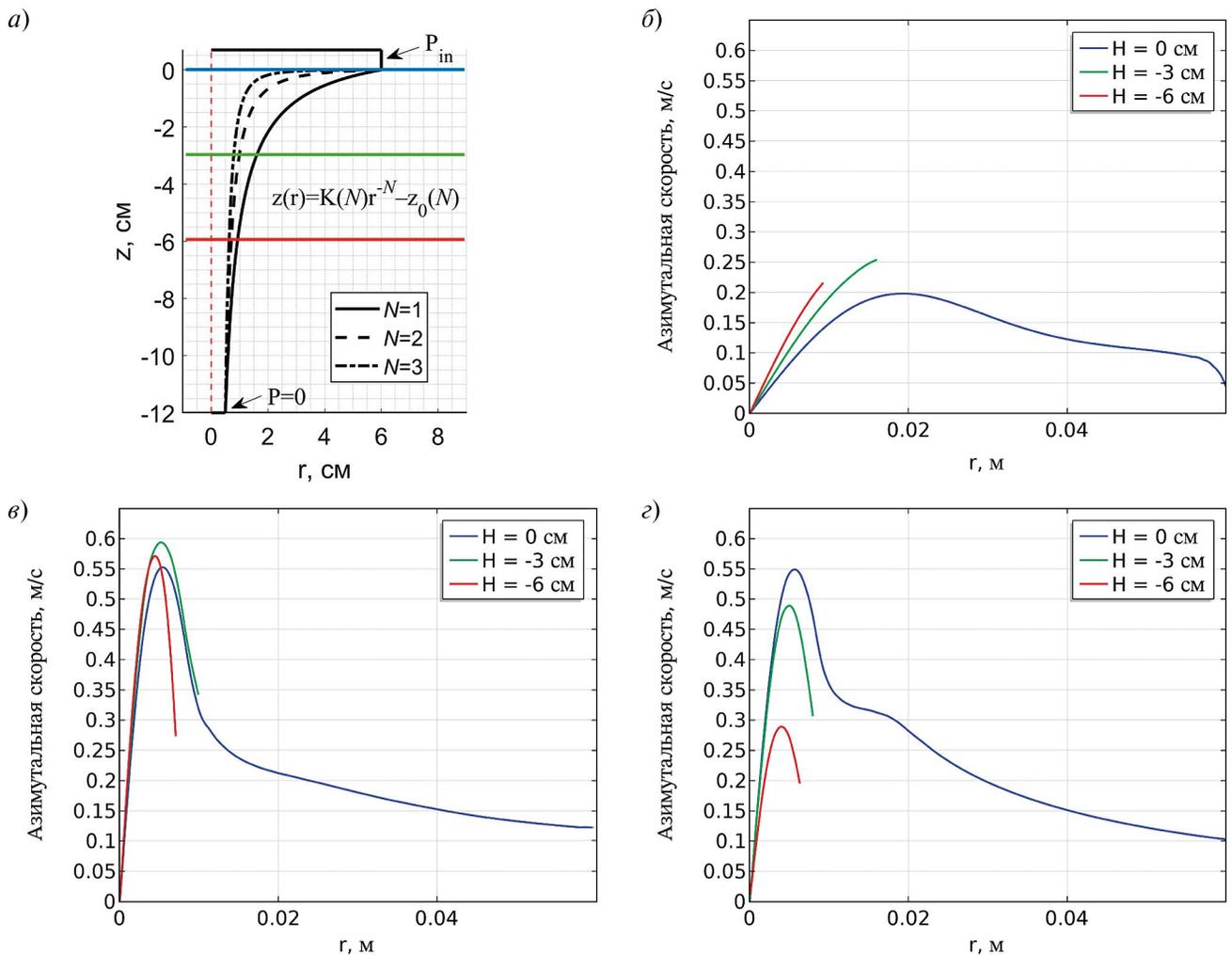


Рис. 8. Линии среза в аксиальной проекции численной модели (а), распределение азимутальной скорости в радиальной проекции для каналов $zR^N = \text{const}$ при $N = 1; 2$ и 3 (б, в, з): Синяя линия – срез на нулевой высоте канала, зеленая кривая – срез на высоте -3 см, зеленая кривая – срез на высоте -6 см. Видно, что устойчивая вихревая структура формируется только в $zR^2 = \text{const}$.

позволяет использовать модель для анализа структурных параметров течения, которые сложно измерить в эксперименте.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЧИСЛЕННОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

1. *Влияние геометрической формы канала на структуру азимутальной составляющей скорости и интегральные потери на вязкое трение.* Для определения различий структуры течений для каналов $zR^N = \text{const}$ с разным показателем степени N , моделирование проводили в стационарном режиме при статическом давлении на входе 5.8 кПа (60 см водяного столба).

Известно, что структура закрученного течения наиболее полно характеризуется распределением азимутальной составляющей скорости $u_\varphi(r, z)$. В развитом вихревом потоке эта составляющая на

всей длине струи имеет локальный максимум при определенном значении радиуса [18].

Распределение данной составляющей для разных геометрических конфигураций каналов определяли при трех значениях продольной координаты ($0, -3$ и -6 см).

Численные определения структуры $u_\varphi(r)$ при $N = 1$ показало, что вихревая структура течения формируется только в начале струи, так как форма канала позволяет течению развиваться в аксиальном направлении. Это выражается в отсутствии локальных максимумов $u_\varphi(r)$ при высотах -3 и -6 см и в преобладании аксиальной составляющей скорости, что качественно уравнивает закрученное и незакрученное течения в этом канале

В каналах $N = 2; 3$ структура $u_\varphi(r)$ обладает выраженным локальным максимумом на всем про-

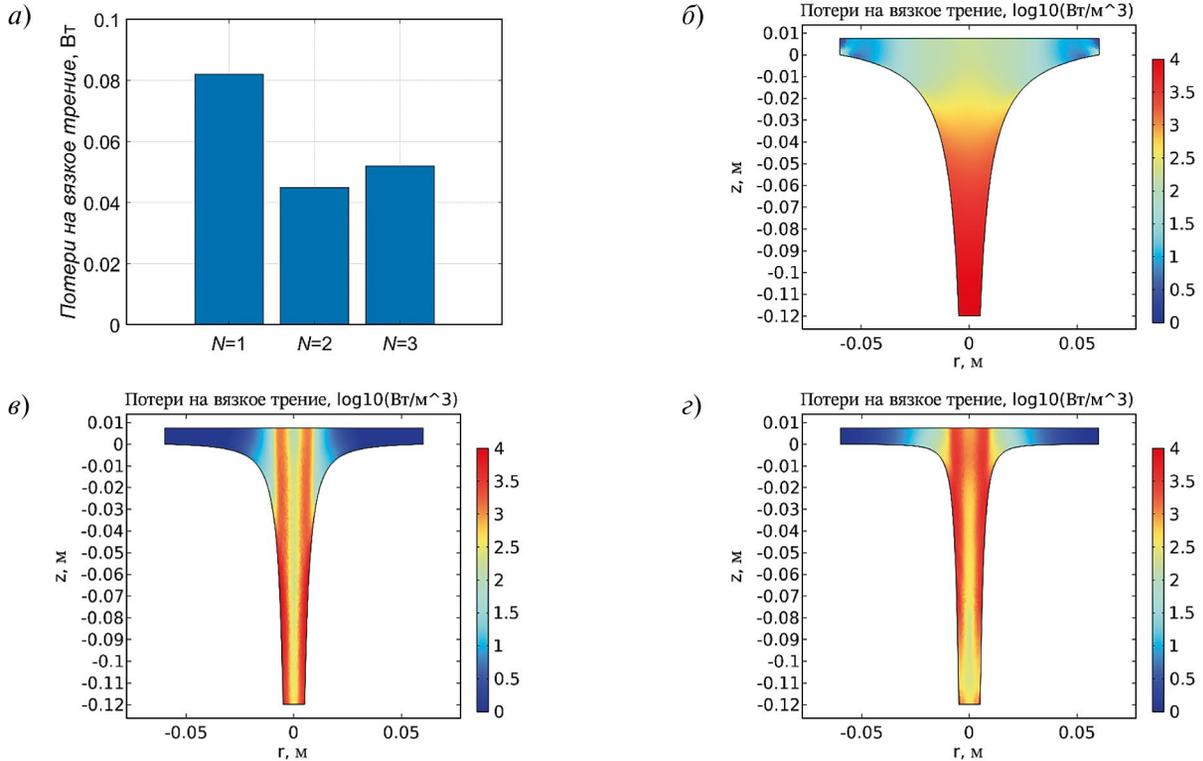


Рис. 9. Интегральные потери на вязкое трение для каналов $zR^N = \text{const}$ разного порядка степени (а), распределение потерь на вязкое трение в каналах при $N = 1$; 2 и 3 (б, в, з) Видно, что в канале с показателем степени $N = 1$ вихревая структура не формируется. В каналах с показателем степени $N = 2, 3$ течение носит вихревой характер, при этом в канале $N = 2$ значения потерь в области формирования вихря ниже, чем в случае $N = 3$.

тяжении струи. Для канала $N = 3$ максимум $u_\varphi(r)$ уменьшается вдоль струи, что говорит о диссипации азимутальной составляющей скорости. Только при $N = 2$ вихревая структура струи поддерживается без изменений на всем протяжении канала (рис. 8).

Для всех трех каналов были вычислены значения объемного интеграла потерь на вязкое трение, определяемого как

$$Q = \int_w \sum_{\tau, j, k} \tau_{\tau, j, k} \cdot Jv_{\tau, j, k} d\omega,$$

где τ – тензор вязких напряжений, Jv – матрица Якоби вектора скорости течения жидкости.

Показано, что наименьшие потери возникают в канале $N = 2$. Значение потерь в канале данной формы на 82% ниже, чем в канале $N = 1$, а также и на 15% ниже, чем в канале $N = 3$ (рис. 9).

Полученная разница может быть объяснена тем, что в канале $N = 1$ потери на вязкое трение увеличиваются из-за большего объема и большей площади обтекания жидкостью стенок при отсутствии развитой вихревой структуры.

В канале $N = 3$ вихревое течение в большей степени контактирует с стенками канала, что приводит к торможению азимутальной составля-

ющей скорости и вырождению вихревой структуры.

Принимая во внимание распределение азимутальных скоростей и потерь на вязкое трение, можно сделать вывод о том, что только в канале с $N = 2$ возникает и поддерживается развитое вихревое течение. Формируемый в данной геометрической конфигурации вихрь позволяет струе распространяться по всей длине канала, испытывая при этом минимальный контакт с его стенками.

Распределение вязкостных сил вдоль обтекаемой поверхности каналов и интеграл вязкостных сил вдоль поверхности каналов приведены на рис. 10. Из представленных изображений видно, что канал, соответствующий $N = 2$, обеспечивает минимум значений потерь на вязкое трение вдоль границ канала, что совпадает с данными распределения потерь на вязкое трение в объеме канала.

Из распределения вязкостных сил вдоль поверхности каналов следует, что в случае показателя степени $N = 1$ жидкость испытывает максимальное взаимодействие со стенками в области суждения около выходного отверстия. Схожие результаты были получены в работе для случая конического канала при моделировании зато-

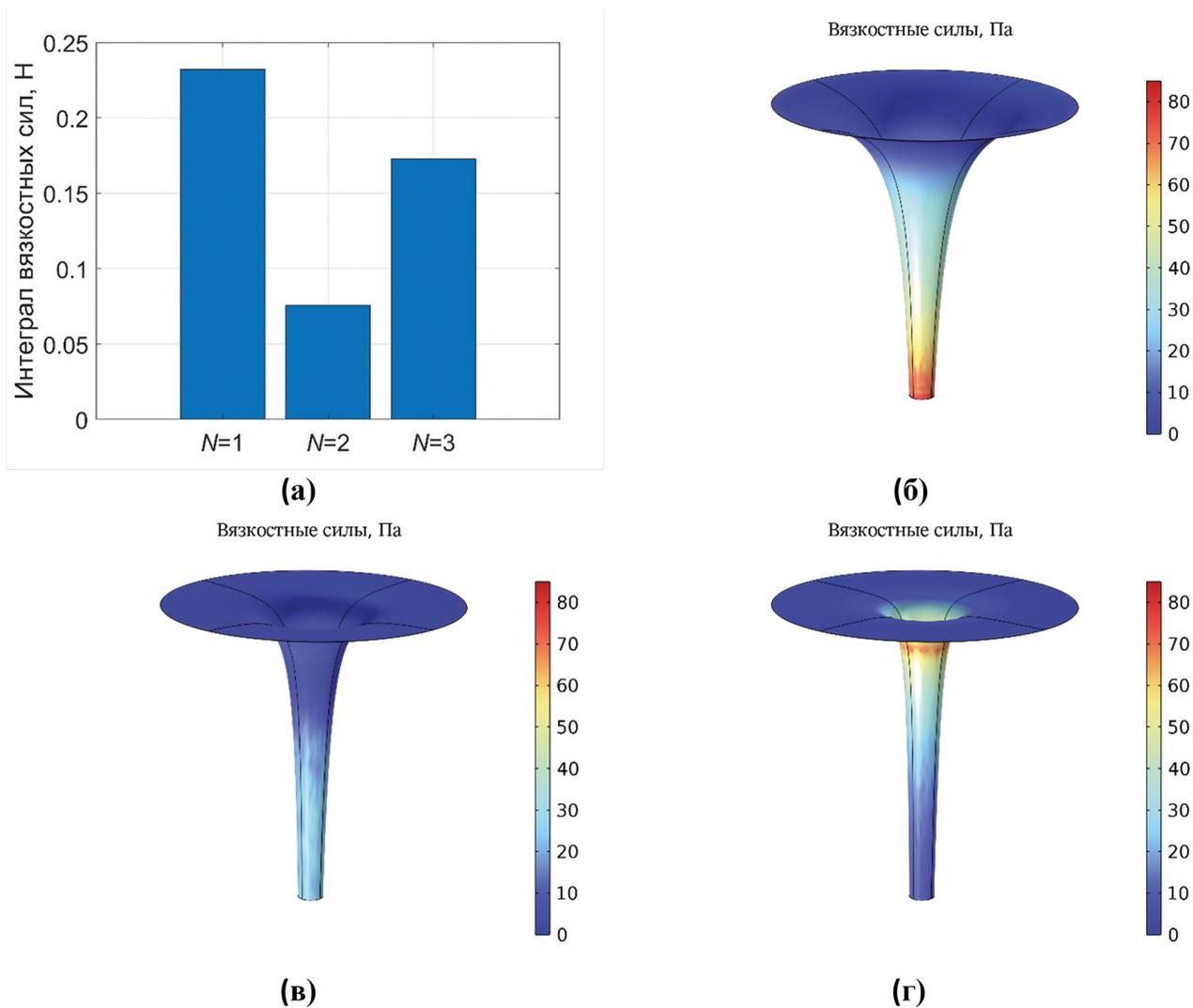


Рис. 10. Интеграл вязкостных сил вдоль обтекаемой поверхности каналов $zR^N = \text{const}$ с показателем степени от 1 до 3 (а), распределения вязкостных сил вдоль обтекаемых поверхностей каналов (б–г). Видно, что в канале с показателем степени $N = 2$ отсутствует явно выраженная область локального максимума вязкостных сил вдоль поверхности канала, а интеграл вязкостных сил минимален из всех рассмотренных случаев.

пленной струи. Это свидетельствует об отсутствии формирования вихревой структуры течения из-за преобладания продольной составляющей скорости на всем протяжении длины канала. В случае показателя степени $N = 3$ вихревое течение формируется, но контактирует со стенками канала в области максимальной кривизны в верхней части системы, что приводит к диссипации вихря, как это видно из рис. 10г.

2. Влияние вогнутой поверхности на распределение потерь на вязкое трение. Как было сказано ранее, механизм формирования закрученной струи предполагает наличие вогнутой поверхности в месте зарождения вихря. Поэтому возник вопрос о влиянии формы и размера данной поверхности в основании струи на структуру азимутальной скорости и интегральные потери на вязкое трение.

В связи с тем, что потери на вязкое трение являются минимальными для геометрической конфигурации канала с показателем степени $N = 2$, численное моделирование по анализу влияния вогнутой поверхности проводили только для этого канала. Пример канала с куполом приведен на рис. 11.

Форму вогнутой поверхности задавали посредством выражения в аксиально-симметричной системе координат:

$$z = -a(k, h)r^2 + h,$$

где k – отношение габаритного радиального размера вогнутой поверхности к входному радиусу канала; h – габаритная высота вогнутой поверхности. Коэффициент полинома определяли в соответствии с габаритными размерами.

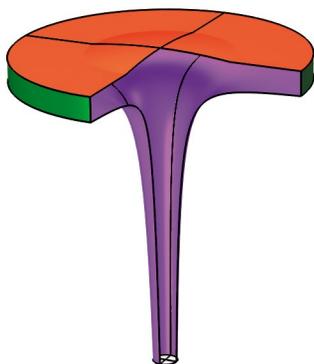


Рис. 11. Пример геометрической конфигурация канала с показателем степени $N = 2$ с вогнутой поверхностью при параметрах габаритной высоты поверхности $h = 5$ мм и отношении габаритного радиального размера вогнутой поверхности к входному радиусу канала $k = 0,5$.

Из приведенных результатов (рис. 12) видно, что при добавлении вогнутой поверхности структура азимутальной скорости меняется. В случае малых размеров поверхности (3 и 5 мм) область вихревого движения расширяется в начале струи, при этом снижается величина азимутальной скорости вдоль струи. Это происходит вследствие контакта со стенками канала в начале струи, что приводит к разрушению вихревой структуры течения.

При увеличении размеров вогнутой поверхности течение сохраняет вихревой характер на всей протяженности струи, а область вихревого течения сильнее расширяется в ее основании. При этом потери на вязкое трение имеют меньшие значения в области зарождения струи, а область максимального контакта вихревого течения со стенками смещается в нижнюю часть канала.

С увеличением размера габаритных размеров вогнутой поверхности возникает тенденция к снижению интегральных потерь на вязкое трение (рис. 13).

Это связано с уменьшением значений локальных потерь на вязкое трение в области формирования вихревого течения и ослаблением взаимодействия закрученной струи со стенками канала.

Таким образом, увеличение размеров поверхности в верхней части канала с показателем степени $N = 2$ способствует уменьшению интегральных потерь на вязкое трение. При стационарных условиях наименьшие потери на вязкое трение достигаются в канале с вогнутой поверхностью высотой 12 мм и отношением радиальных размеров, равных 0.95. Тем не менее, стационарные распределения в канале не могут в полной мере являться аналогией потока крови в системе кровообращения, т.к. в сердечно-сосудистой системе поток является пуль-

сирующим и обладает значительными перепадами давлений. Основной характеристикой течения в таких условиях является распределение сдвиговых напряжений в ядре потока и на его границах. Для определения структуры сдвиговых напряжений задача численного моделирования должна быть решена в динамическом режиме.

3. Анализ сдвиговых напряжений в динамическом режиме. Динамическое моделирование потока состояло в симуляции физиологических перепадов давления на входе в канал аналогично перепадам давления в левом желудочке сердца. В данном случае для этого использовалась функция $P_{in}(t)$, имитирующая систолу сердечного цикла (рис. 14).

Определение структуры сдвиговых напряжений в объеме канала производили согласно выражению

$$F(x, y, z, t) = \mu(x, y, z, t) \gamma(x, y, z, t)$$

где $\mu(x, y, z, t)$ – распределение динамической вязкости жидкости в системе; $\gamma(x, y, z, t)$ – скорость сдвиговых деформаций.

В динамическом режиме сравнивали два геометрических варианта канала $zR^2 = \text{const}$: при наличии вогнутой поверхности с высотой 12 мм и в случае ее отсутствия.

Было получено, что наличие поверхности в основании канала в динамическом режиме снижает максимальное сдвиговое напряжение в потоке вдвое (рис. 15, 16). Из представленной структуры модельного течения видно, что областью максимальных сдвиговых напряжений в канале является стенка в области сужения. В случае отсутствия поверхности повышенные сдвиговые напряжения также локализируются в области формирования струи, что является следствием более высоких значений азимутальной скорости в этой зоне. Очевидно, что уровень сдвиговых напряжений в канале при наличии вогнутой поверхности значительно снижен.

Для более детального анализа влияния сдвиговых напряжений было проведено определение структуры временного интеграла сдвиговых напряжений на протяжении сердечного цикла, которое определяется по формуле

$$F(t) = \int_0^t \mu(r, z) \gamma(r, z) dt.$$

Получено, что в отсутствие поверхности жидкость в пространстве канала испытывает более высокие воздействия со стороны сдвиговых напряжений (двукратное отличие) (рис. 17) на всем течении струи. В случае наличия поверхности основными местами локализации действия сдвиговых

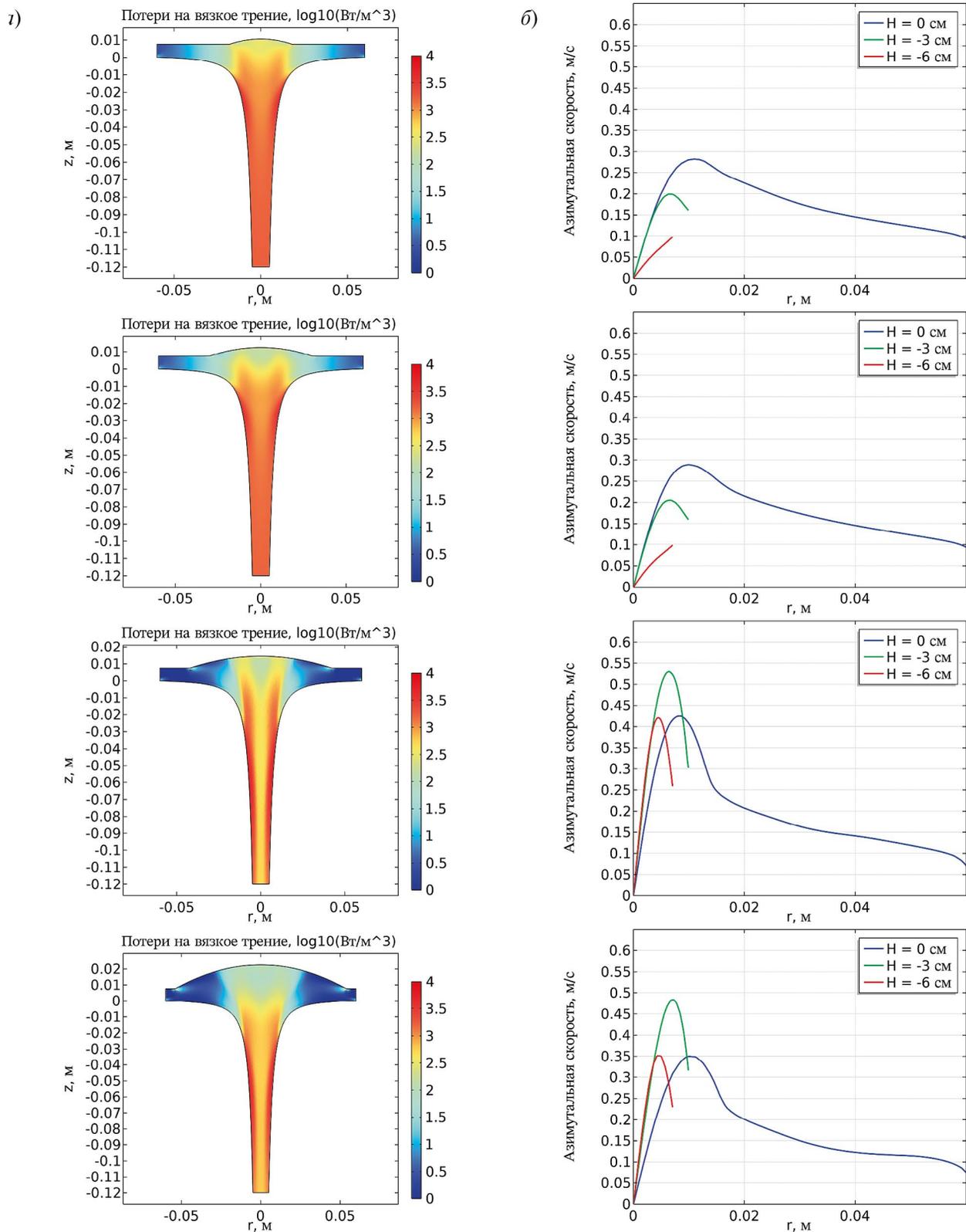


Рис. 12. Распределение потерь на вязкое трение (а) и структура азимутальных скоростей (б) при различных размерах вогнутой поверхности. Видно, что с увеличением добавочного объема, создаваемого вогнутой поверхностью, течение становится вихревым с расширением области формирования вихря, что способствует снижению потерь в этой зоне.

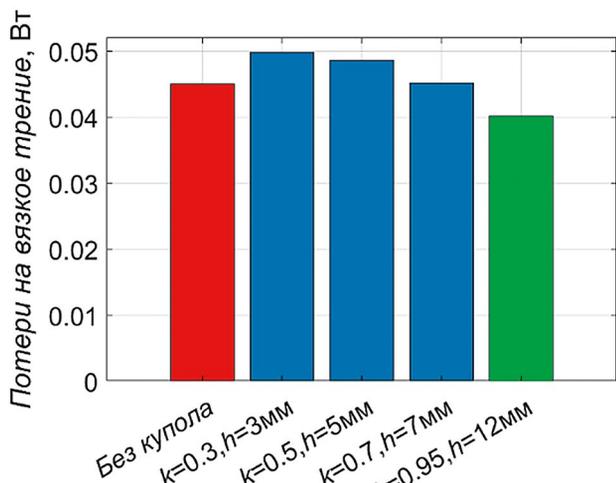


Рис. 13. Удельные потери на вязкое трение при различных габаритных размерах вогнутой поверхности: k – отношение габаритного радиуса вогнутой поверхности к максимальному радиусу канала, h – габаритная высота вогнутой поверхности. Видно, что с увеличением добавочного объема, создаваемого вогнутой поверхностью, интегральные потери на вязкое трение уменьшаются. При максимальном объеме потери на вязкое трение становятся ниже, чем в случае отсутствия вогнутой поверхности.

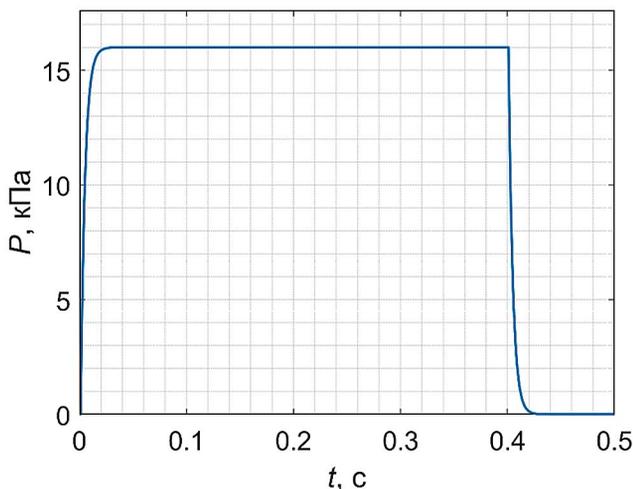


Рис. 14. Расчетная осциллограмма импульса статического давления на входе в канал при динамическом моделировании, имитирующая систолу сердечного цикла.

напряжений являются только пристеночные области в зоне сужения канала.

Таким образом, наличие вогнутой поверхности достаточного объема в канале с продольно-радиальным профилем $zR^2 = \text{const}$ позволяет снизить как максимальные значения сдвиговых напряжений, так и действие сдвиговых напряжений в пространстве канала при имитации сердечного цикла.

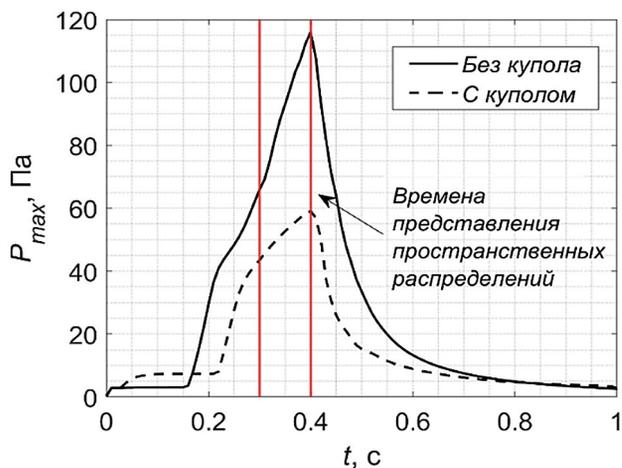


Рис. 15. Значения максимальных сдвиговых напряжений, возникающих в канале второго порядка в зависимости от времени при наличии и в отсутствии вогнутой поверхности максимального объема: сплошная линия – максимальные сдвиговые напряжения в канале без вогнутой поверхности, прерывистая линия – максимальные сдвиговые напряжения в канале при ее наличии. Красными линиями отмечены моменты времени для представления структуры сдвиговых напряжений. Видно, что наличие вогнутой поверхности максимального объема способствует двукратному снижению максимальных сдвиговых напряжений в канале.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Уже на протяжении почти 100 лет известно, что поток крови в сердце и магистральных сосудах имеет закрученный характер, что обусловлено динамическими характеристиками анатомии сердца и сосудов. Однако этот факт известен лишь на феноменологическом уровне. При этом очевидно, что механизм движения крови должен обеспечивать высокие расходные характеристики потока при минимизации потерь на вязкое трение и отсутствии локальных нарушений структуры потока в виде застойных или отрывных явлений.

Ранее было опубликовано, что динамическая пространственная геометрия проточных каналов сердца и аорты в норме может быть аппроксимирована посредством двух поверхностей, соответствующих каналу с продольно-радиальным профилем $zR^2 = \text{const}$ и вогнутой поверхности, вдоль которой кровь поступает в соответствующую полость. В работе проводили экспериментальное и модельное сравнение течения в канале, форма которого соответствует $zR^2 = \text{const}$, и в нескольких каналах, близких к нему по форме, отличающихся показателем степени.

Физический эксперимент при имеющихся измерительных средствах не позволил выявить явных различий между исследуемыми каналами, однако

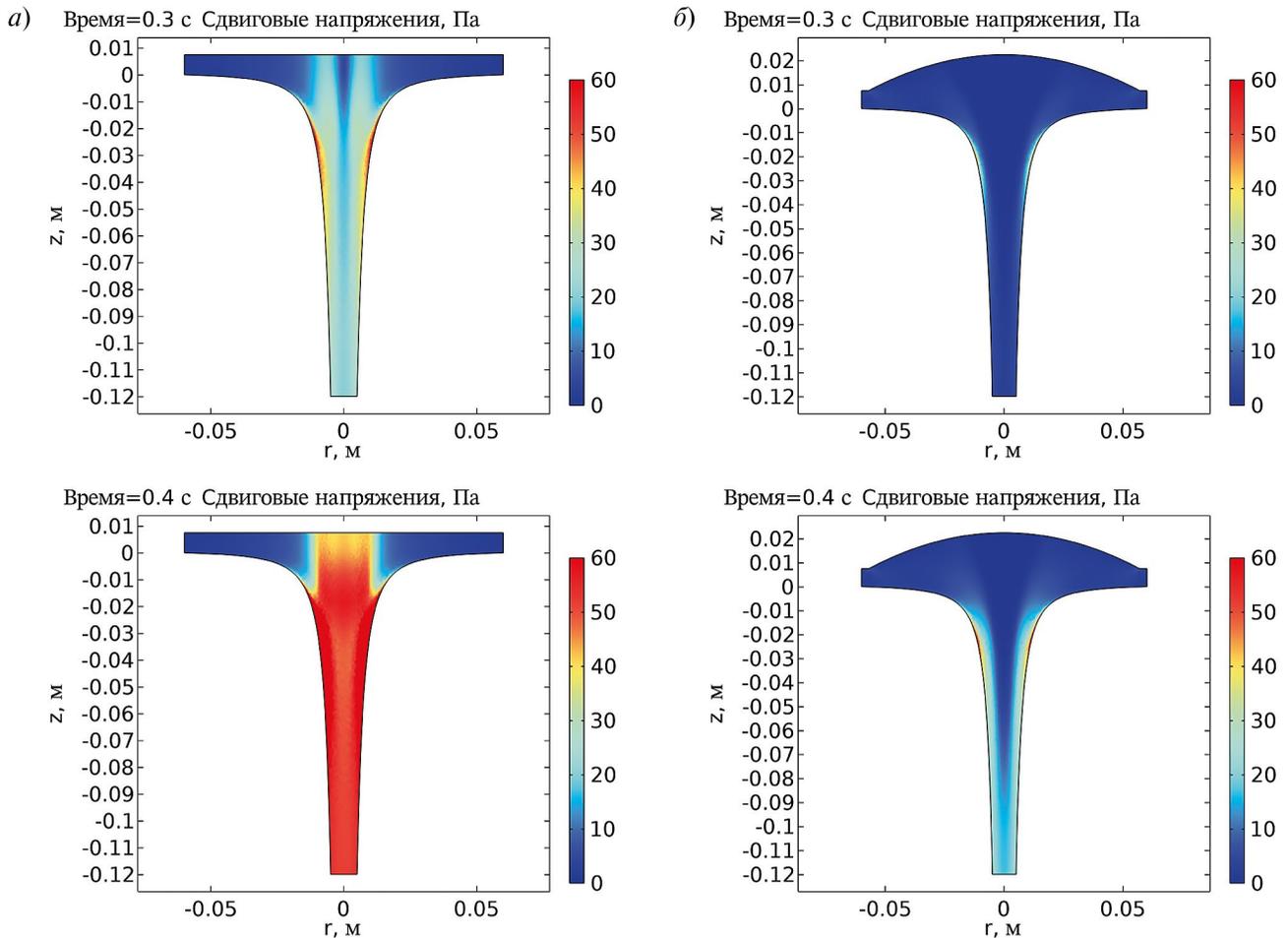


Рис. 16. Значения максимальных сдвиговых напряжений, возникающих в канале второго порядка в зависимости от времени при наличии и в отсутствие вогнутой поверхности максимального объема: сплошная линия — максимальные сдвиговые напряжения в канале без вогнутой поверхности, прерывистая линия — максимальные сдвиговые напряжения в канале при ее наличии. Красными линиями отмечены моменты времени для представления структуры сдвиговых напряжений. Видно, что наличие вогнутой поверхности максимального объема способствует двукратному снижению максимальных сдвиговых напряжений в канале.

позволил осуществить валидацию численной модели посредством совпадения расходных характеристик и форм линий тока при равных условиях.

Численное моделирование, в свою очередь, показало, что канал, обеспечивающий минимум интегральных потерь на вязкое трение, соответствует продольно-радиальному профилю $zR^2 = \text{const}$, а течение, формируемое в канале данной формы, носит вихревой характер. Это подтверждено при симуляции пульсирующего закрученного течения в диапазоне давлений, действующих в сердце и аорте. При этом показано, что наличие вогнутой поверхности, обеспечивающей достаточный дополнительный объем, обеспечивает как преимущества в отношении минимизации потерь на вязкое трение, так и снижение интегральных сдвиговых напряжений при более равномерном распределении поля сдвиговых напряжений в канале.

Снижение сдвиговых напряжений обеспечивает условия для стабильного состояния биологически активных элементов крови и стенок проточного канала. Уровень сдвиговых напряжений, действующих в потоке этого типа существенно ниже величин, при которых происходят активация и повреждение форменных элементов крови и эндотелия [19, 20], что создает достаточный компенсаторный резерв, необходимый при развитии патологических состояний. Однако при возникновении серьезных нарушений динамической геометрии проточного канала (напр., стеноз или недостаточность клапанов сердца, установка протеза клапана, нарушение локальной сократимости сердечной стенки, нарушения ритма, изменение упруго-деформационных свойств стенки проточного канала сердца и аорты и т.д.) сдвиговые напряжения могут достигать высоких значений и усугублять состояние кровообращения.

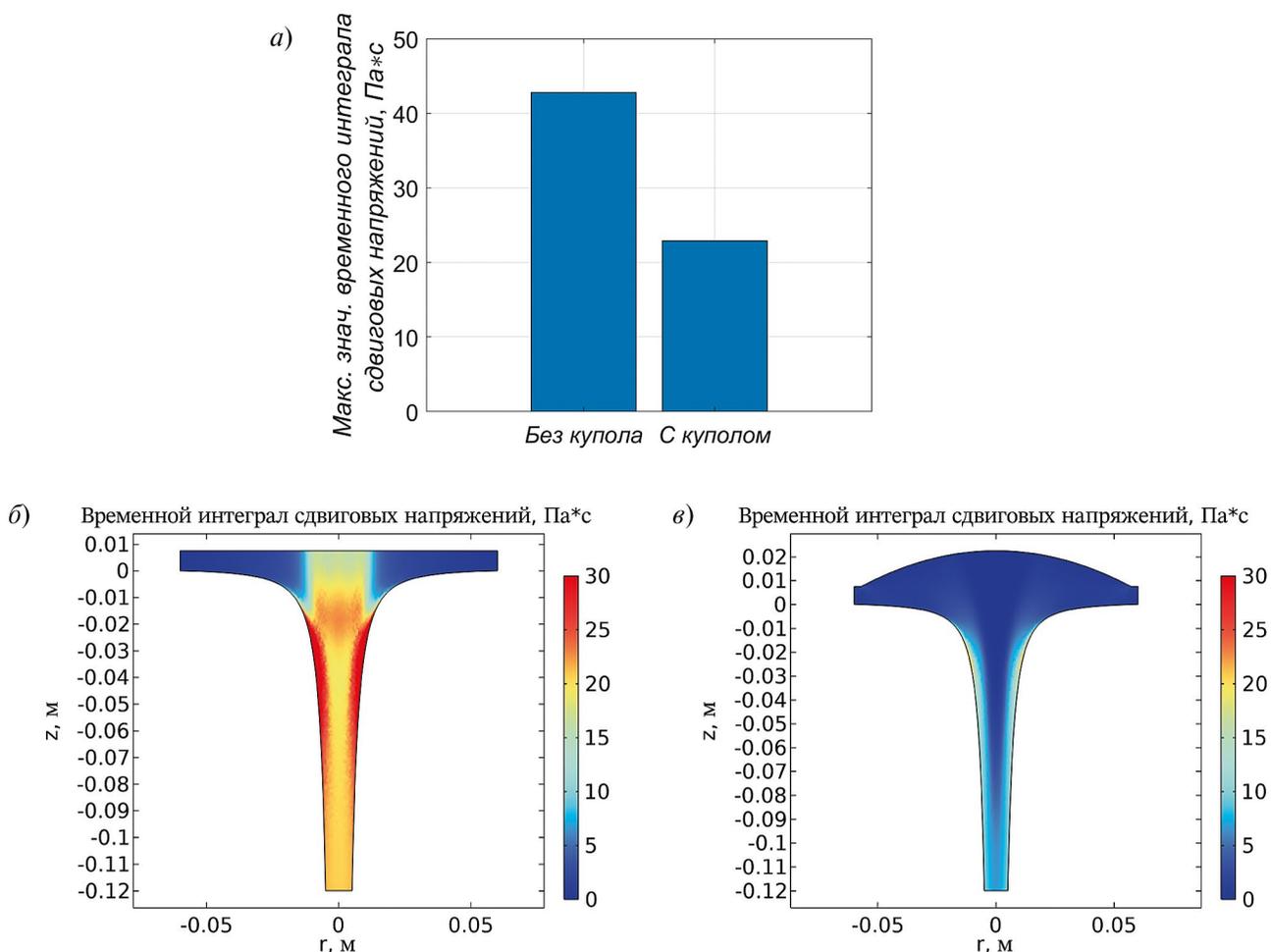


Рис. 17. Максимальные значения временных интегралов сдвиговых напряжений в каналах при наличии и при отсутствии вогнутой поверхности (а), структура интеграла действия сдвиговых напряжений в этих каналах (б, в). Видно, что наличие вогнутой поверхности позволяет снизить воздействие сдвиговых напряжений в два раза в пристеночной зоне, а такжекратно снижает их действие в области формирования вихревого движения.

Следует упомянуть, что полученные величины потерь являются малой величиной в сравнении с общей мощностью массопереноса жидкости. В настоящей работе величина потерь на вязкое трение использовалась только для сравнительного анализа. Тем не менее в аппроксимируемой динамической геометрии сердечно-сосудистой системы потери на вязкое трение могут быть существенно выше, так как действительная физиологическая система функционирует в значительно более широком диапазоне давлений. Сохранение преимуществ вихревого характера при более высоких давлениях совместно с учетом динамического характера течения является целью дальнейшей работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании гидродинамических экспериментов и численного моделирования закрученного потока в каналах простой геометрической формы, соответствующей функциям, аппроксимирующим форму

анатомических проточных каналов сердца и аорты, показано, что развитая вихревая структура потока поддерживается только в каналах, вдоль которых выполняется соотношение $zR^2 = \text{const}$. Если такой канал дополнен вогнутой обтекаемой поверхностью в основании (при z , близком к 0), при закрученном режиме течения среды достигается минимум интегральных вязких потерь, а в динамическом режиме — двукратное снижение пиковых и интегральных сдвиговых напряжений. Это говорит о том, что закрученная структура потока существенно увеличивает диапазон объемной скорости крови, при которой выполняются условия физиологической стабильности биологически активных клеточных и белковых компонентов крови и эндотелиальной выстилки каналов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00148).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева” Минздрава России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Frazin L.J., et al.* Confirmation and initial documentation of thoracic and abdominal aortic helical flow. An ultrasound study // *ASAIO Journal (American Society for Artificial Internal Organs)*: 1992). 1996. Т. 42. №. 6. С. 951–956.
2. *Gorodkov A., Dobrova N.B., Kuzmina N.B., et al.* Anatomical structures determining blood flow in the heart left ventricle // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1996. V. 7. № 3. P. 153–160.
3. *Жоржколиани Ш.Т., Миронов А.А., Талыгин Е.А. и др.* Анализ динамической геометрической конфигурации проточного канала аорты с позиций смерчевой самоорганизации потока крови // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017. Т. 164. № 10. С. 519–524.
4. *Кикнадзе Г.И. и др.* О структуре потока в левом желудочке сердца и аорте с применением точных решений нестационарных уравнений гидродинамики и морфометрических исследований // *Докл. АН*. 1996. Т. 351. №. 1. С. 119.
5. *Bockeria L.A., Gorodkov A.Y., Kiknadze G.I., Gachechiladze I.A.* Application of Tornado-flow fundamental hydrodynamic theory to the study of blood flow in the heart – Further development of Tornado-like jet technology // *ASME 2011 International Mechanical Engineering Congress and Exposition, IMECE 2011, Denver, CO, 11–17 ноября 2011 г.* V. 2. Denver, CO, 2011. P. 287–296.
6. *Талыгин Е.А., Зазыбо Н.А., Жоржколиани Ш.Т. и др.* Количественная оценка состояния внутрисердечного потока крови по динамической анатомии левого желудочка сердца на основании точных решений нестационарных уравнений гидродинамики для класса смерчеобразных потоков вязкой жидкости // *Успехи физиологических наук*. 2016. Т. 47, № 1. С. 48–68.
7. *Zhorzholiani S.T., Talygin E.A., Krashennnikov S.V., et al.* Elasticity Change along the Aorta is a Mechanism for Supporting the Physiological Self-organization of Tornado-like Blood Flow // *Human Physiology*. 2018. V. 44. № 5. P. 532–540.
8. Г.И. Кикнадзе, Ю.К. Краснов. Эволюция смерчеобразных течений вязкой жидкости // *Докл. АН СССР*, 290:6 (1986). 1315–1319.
9. *Burgers J.M.* A mathematical model illustrating the theory of turbulence // *Advances in applied mechanics*. 1948. T. 1. C. 171–199.
10. *Кикнадзе Г.И., Талыгин Е.А., Городков А.Ю.* Патент № 2691705 С1 Российская Федерация, МПК F15D 1/00. Способ отсасывания пограничного слоя сплошной среды с поверхности тела и устройство для его реализации : № 2018119493 : заявл. 28.05.2018 : опубл. 17.06.2019
11. *Пиралишвили Ш.А., Писаревский А.С.* Численное моделирование вихревого эффекта в несжимаемой жидкости // *Известия Российской академии наук. Механика жидкости и газа*. 2013. №. 3. С. 138–147.
12. *Гайфуллин А.М., Жвик В.В.* Взаимодействие двух противоположно закрученных затопленных струй // *Известия РАН. Механика жидкости и газа*. 2019. № 3. С. 48–57.
13. *Платонов Д.В., Минаков А.В., Дектерев А.А., Сентябов А. В.* Численное моделирование пространственных течений с закруткой потока // *Компьютерные исследования и моделирование*. 2013. Т. 5. № 4. С. 635–648.
14. *Высотина В.Г.* Структура закрученного течения в осесимметричных каналах // *Матем. моделирование*. 2003. Т. 15. № 1. С. 69–77.
15. *Shipkowitz T., et al.* Numerical study on the effect of steady axial flow development in the human aorta on local shear stresses in abdominal aortic branches // *Journal of biomechanics*. 1998. T. 31. №. 11. C. 995–1007.
16. *Wilcox D.C.* Formulation of the kw turbulence model revisited // *AIAA journal*. 2008. T. 46. №. 11. C. 2823–2838.
17. *Versteeg H.K., Malalasekera W.* An introduction to computational fluid dynamics: the finite volume method. – Pearson education, 2007.
18. *Митрофанова, О.В.* Гидродинамика и теплообмен закрученных потоков в каналах с завихрителями. // *Теплофизика высоких температур*. 2003. Т. 41. № 4. С. 587–633.
19. *Brown C.H., et al.* Morphological, biochemical, and functional changes in human platelets subjected to shear stress // *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1975. T. 86. – №. 3. C. 462–471.
20. *Sutera S.P.* Flow-induced trauma to blood cells // *Circulation research*. 1977. T. 41. №. 1. C. 2–8.

EXPERIMENTAL AND MODEL STUDY OF SWIRLING FLUID FLOW IN A CONVERGING CHANNEL AS A SIMULATION OF BLOOD FLOW IN THE HEART AND AORTA

Ya. E. Zharkov, Sh. T. Zhorzholiani, A. A. Sergeev, A. V. Agafonov, A. Y. Gorodkov[#]

Academician of the RAS L. A. Bockeria

A. N. Bakulev National Medical Research Center for Cardiovascular Surgery, Moscow, Russian Federation

[#]E-mail: agorodkov@bk.ru

The study of swirling flows in channels corresponding to the static approximation of flow channels of the heart and major vessels with a longitudinal-radial profile $zR^2 = \text{const}$ and a concave streamlined surface at the beginning of the longitudinal coordinate has been carried out. A comparative analysis of the flow structure in channel configurations $zR^N = \text{const}$, where $N = -1; 1; 2; 3$, in the absence and presence of a concave surface was carried out. The numerical modelling was compared with the results of hydrodynamic experiments on the flow characteristics and the shape of the flow lines. The numerical model was used to determine the velocity structure, viscous friction losses and shear stresses. Numerical modelling of steady-state flows for channels without a concave surface showed that in the channel $zR^2 = \text{const}$ there is a stable vortex flow structure with the lowest viscous friction losses. The presence of a concave surface of sufficient size significantly reduces viscous friction losses and shear stresses in both steady state and pulsed modes.

Keywords: vortex flows, flow channel shape, heart and vessel shape approximation, swirling blood flow, viscous friction losses, shear stress.

УДК 569.325.1+591.4+56.074.6

НОВЫЕ ДАННЫЕ ПО ЭКОЛОГИИ ИСКОПАЕМОГО ДОНСКОГО ЗАЙЦА (*LEPUS TANAITICUS* [GUREEV, 1964])

© 2024 г. М. Р. Павлова^{1,*}, Г. Г. Боескоров², М. Ю. Чепрасов^{3,4}, Г. П. Новгородов³,
Рекомендовано академиком РАН Д. С. Павловым

Поступило 15.12.2023 г.

После доработки 12.01.2024 г.

Принято к публикации 15.01.2024 г.

Впервые проведено палинологическое исследование содержимого желудочно-кишечных трактов и отложений, вмещавших замороженные мумии ископаемого донского зайца, обнаруженных в отложениях ледового комплекса верхнего плейстоцена в Верхоянском районе Якутии. Датирование по радиоуглероду (C^{14}) выявило, что найденные зайцы обитали во время каргинского интерстадиала позднего плейстоцена, 32.5 тыс. лет назад (калиброванная дата). В результате расширены представления об экологии вымершего *Lepus tanaiticus*: этот вид обитал в холодных степях с доминированием ксерофитных сообществ, а также на лугах злаково-разнотравных и осоково-разнотравных; в отличие от современного зайца-беляка *L. timidus*, питающегося в зимнее время в основном ветками и корой древесных растений и кустарников, рацион донских зайцев зимой главным образом состоял из травянистых растений.

Ключевые слова: вымерший донской заяц, *Lepus tanaiticus*, замороженные мумии, вмещающие отложения, желудочно-кишечный тракт, спорово-пыльцевой метод, экология, Якутия, поздний плейстоцен.

DOI: 10.31857/S2686738924020205, EDN: WDXRHZ

Якутия является одним из регионов в мире, где распространена реликтовая мерзлота, в которой сохраняются многочисленные остатки животных мамонтового биома позднего плейстоцена. Наиболее частыми находками являются замороженные трупы крупных млекопитающих, таких как мамонты, шерстистые носороги, древние лошади, степные бизоны, и более редкими – находки мелких млекопитающих, таких как зайцеобразные и грызуны. Одним из важных аспектов исследования трупов вымерших животных является получение информации об их экологии (среде обитания, особенностях рациона, палеомикрофлоре и т.д.).

Недавно сообщалось о находке замороженного трупа вымершего вида – донского зайца (*Lepus tanaiticus* [Gureev, 1964]) позднплейстоценового возраста на территории Абыйского райо-

на Республики Саха (Якутия) [1]. В 2016 г. местными жителями в Верхоянском районе Якутии на местонахождении Юнюген (среднее течение р. Яна) в многолетнемерзлых отложениях верхнего плейстоцена обнаружены в одном захоронении два трупа зайцев и задняя часть туловища третьей особи с ногами (рис. 1а–в). При первоначальном обследовании шерсти ископаемых зайцев было установлено, что она имеет серовато-коричневый, сероватый и грязно-белый цвет вследствие загрязнения рыхлыми отложениями, вмещавшими мумии (рис. 1). Шерсть, отмытая от загрязнения, имеет белый цвет, что характерно для современного зайца-беляка *Lepus timidus* [Linnaeus, 1758] в зимнее время. Заяц № Уп-2/16 сохранился лучше всего (рис. 1а), шерстный покров на нем сохранился почти полностью и на теле поврежденных не выявлено.

Заяц № Уп-3/16 (см. рис. 1б) сохранился хуже: на его черепе имеются разломы, позвоночник сломан. У обеих мумий сохранились внутренние органы и остатки желудочно-кишечных трактов. От зайца № ММ-F29 (см. рис. 1в) сохранилась задняя половина тела с ногами и частью кишечника. Упомянутые находки были переданы в Музей мамонта им. П. А. Лазарева СВФУ им. М. К. Аммосова (г. Якутск), где хранятся в замороженном виде.

¹Институт мерзлотоведения им. П. И. Мельникова
СО РАН, Якутск, Россия

²Институт геологии алмаза и благородных металлов
СО РАН, Якутск, Россия

³Северо-Восточный федеральный университет им.
М. К. Аммосова, Якутск, Россия

⁴г. Якутский научный центр СО РАН, Якутск, Россия

*E-mail: nigaer@yandex.ru

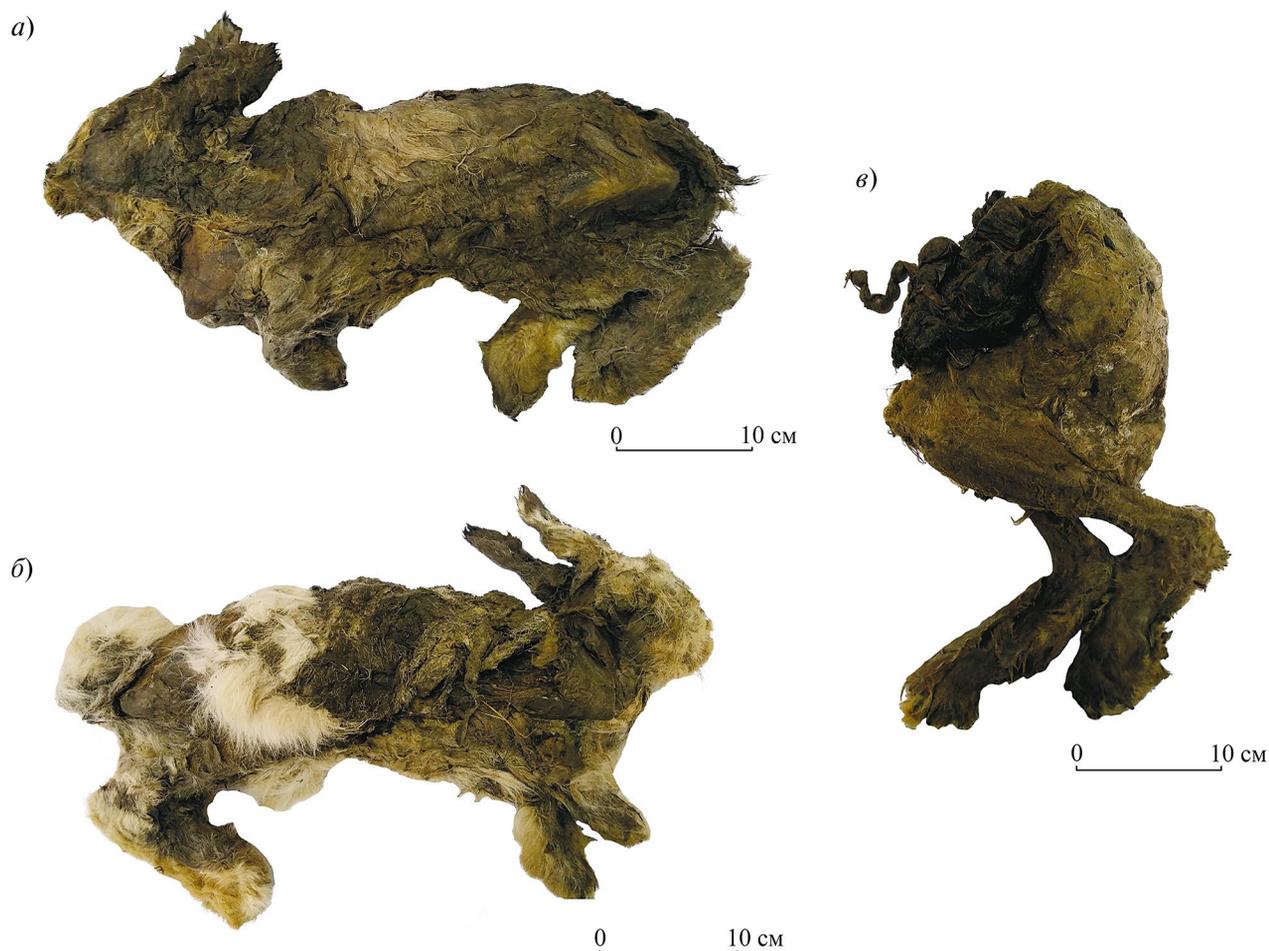


Рис. 1. Мумии донских зайцев с местонахождения Юнюгена: а – № Yn-2/16; б – Yn-3/16; в – MM-F29.

Изучение полных митохондриальных геномов зайцев с Юнюгена показало, что, с одной стороны, они филогенетически близки митогеномам голоценовых *L. tanaiticus* с Северного Урала (датированных 6–3 тыс. лет назад), а с другой стороны – митогеномам рецентных *L. timidus* [2], что свидетельствует об активном формообразовании среди *L. tanaiticus* в конце плейстоцена, приведшем к появлению зайца-беляка.

Согласно данным радиоуглеродного датирования зайцы с Юнюгена обитали в конце каргинского интерстадиала позднего плейстоцена [2] – $28\,360 \pm 170$ ^{14}C лет назад (32500 ± 340 калиброванных лет назад (кал. л. н.)).

В целях изучения особенностей состава растительности ландшафтов во время существования ископаемых донских зайцев, а также состава их питания проведено палинологическое исследование вмещающих их мумии отложений и желудочно-кишечных трактов (ЖКТ) животных.

Спорово-пыльцевой анализ проведен для трех проб содержимого желудочно-кишечных трактов

(ЖКТ) от трех зайцев с Юнюгена и двух образцов вмещающих отложений. Химическая подготовка препаратов выполнена по адаптированной методике, основанной на методах В. П. Гричук [3] и К. Фаегри – Дж. Иверсена [4]. Определение пыльцы составляло не менее 300 зерен, также подсчитывались споры, угольки, грибы, остатки амёб, водоросли и другие непыльцевые палиноморфы. Микрофотографии некоторых пыльцевых зерен и спор, отмеченные в препаратах, приведены на рис. 2.

Во всех исследованных пробах в общем составе палинологических спектров отмечается преобладание пыльцы травянистых растений и кустарничков – 90.7–99.8% (рис. 3) с доминированием полынью *Artemisia* (28.8–58.3%) и злаковых *Poaceae* (29.9–49.7%). По морфологическим признакам среди пыльцы *Poaceae* выделяются четыре разновидности, но определить до видовой принадлежности не представляется возможным. Содержание пыльцы древесно-кустарниковых растений варьируется от 0 до 1.2%, спор – от 0.2 до 2.6%.

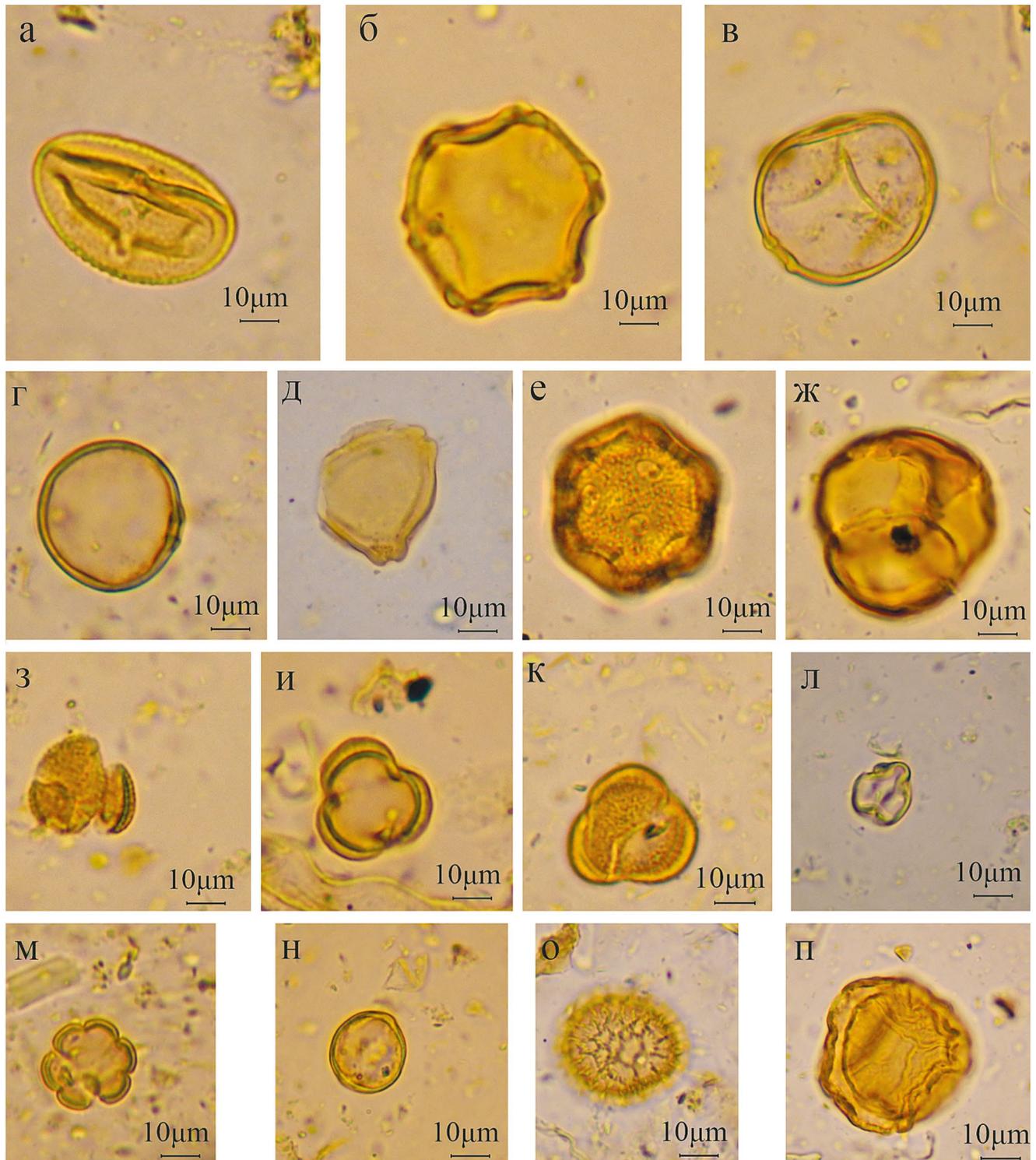


Рис. 2. Фотографии некоторой пыльцы растений и спор в пробах донских зайцев, местонахождение Юнйюген: а – *Salix*, б – *Alnus*, в, г – *Rosaceae*, д – *Betula* sect. *Fruticosa*, е – *Caryophyllaceae*, ж – *Ericales*, з – *Brassicaceae*, и, к – *Artemisia*, л – *Rosaceae*, м – *Sanguisorba*, н – *Polygonaceae*, о – *Lycopodium pungens*, п – *Selaginella rupestris*.

Спорово-пыльцевые спектры из желудочно-кишечных трактов *Lepus tanaiticus* содержат пыльцевые зерна разнотравья, принадлежащие степным и лугово-степным растительным сообществам. В спек-

трах преобладают розоцветные – *Rosaceae gen. sp.*, *Sanguisorba* – до 5.8%. От 0.5 до 1% отмечаются крестоцветные *Brassicaceae*, от 0.4 до 0.6% – гвоздичные *Caryophyllaceae*, от 0.2 до 0.6% осоковые *Cyperaceae*;

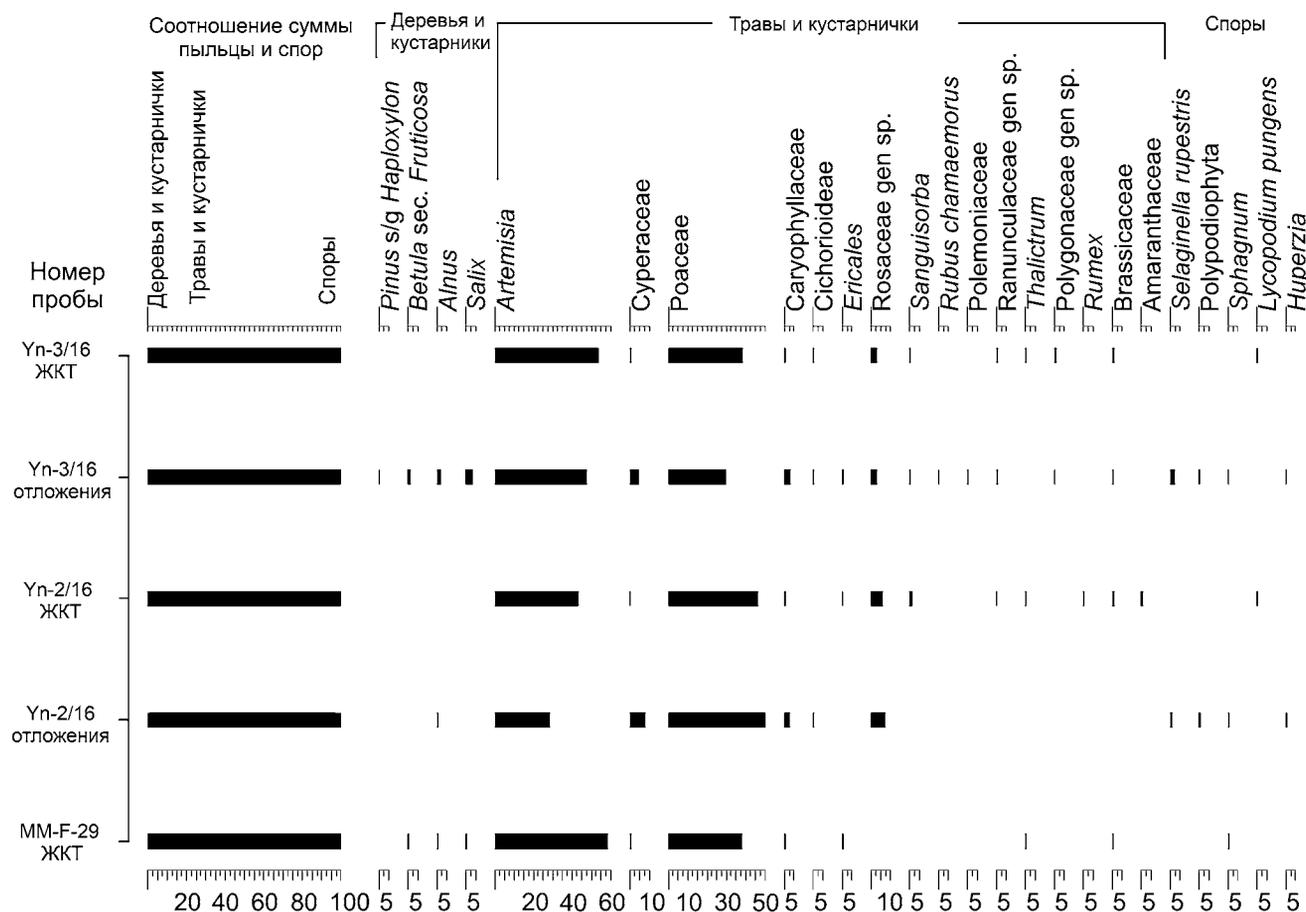


Рис. 3. Результаты подсчета пыльцы и спор в пробах донских зайцев, в %.

единично – амарантовые *Amaranthaceae*, лютиковые (*Ranunculaceae gen. sp.*, *Thalictrum*), гречишные (*Polygonaceae gen. sp.*, *Rumex*), цикориевые *Cichorioideae*, верескоцветные *Ericales*. Древесно-кустарниковые растения почти не отмечаются, только в образце № MM-F29 зафиксировано несколько зерен кустарниковых видов берез *Betula sect. Fruticosa*, ивы *Salix* и ольхи *Alnus*. Споры представлены *Lycopodium pungens*, *Huperzia* и *Sphagnum*.

Спектры вмещающих отложений также включают пыльцевые зерна степных и лугово-степных сообществ, но процентное содержание их выше. Доминирует пыльца *Rosaceae gen. sp.* до 7.5%, *Caryophyllaceae* 2.6–3.3%, *Cyperaceae* 4.7–7.8%. Присутствуют синюховые *Polemoniaceae*, *Polygonaceae gen. sp.*, *Brassicaceae*, кустарнички – морощка обыкновенная *Rubus chamaemorus* и *Ericales*. Содержание древесно-кустарниковых растений (*Betula sect. Fruticosa*, *Alnus*, *Salix*) в сравнении с образцами зайцев больше и составляет до 6.7% (проба № Yn-3/16_отложения). Отмечена единичная пыльца *Pinus s/g Haploxyylon*, возможно, кедрового стланика *Pinus pumila*. Споры (*Selaginella rupestris*, *Sphagnum*, *Polypodiophyta*) составляют до 2.6%.

В образцах зайцев (№ Yn-3/16_ЖКТ, № Yn-2/16_ЖКТ и № MM-F29_ЖКТ) выявлено большое количество фрагментов спиралевидной формы, что является признаком на наличие растительных волокон кормофитов, но без возможности определения конкретного типа растительности [5], или спиралевидные трахеиды (*Cormophyta*), предположительно из корней осоковых (*Cyperaceae*) [6]. В образцах присутствуют споры разнообразных грибов, но неопределенного типа, только в пробах № Yn-3/16_отложения, № Yn-2/16_отложения инфицирован копрофильный гриб *Glomus*, а также угольки.

Полученные данные позволяют установить, что преобладающее место в питании *Lepus tanaiticus* занимали разнообразные виды злаков и разнотравье, главным образом гвоздичные и розоцветные, некоторые виды осоковых и молодые ветки ольхи. Отмеченное большое количество в спектрах пыльцевых зерен *Artemisia* указывает на то, что, возможно, в рацион зайцев входили некоторые виды этих растений. Вероятно, частично пыльца полыней иногда попадала в корм с другой пищей, так как она имеет повышенную пыльцевую продуктивность и в спектрах степных сооб-

шеств нередко преобладает и суммарно подавляет пыльцу ведущих доминантов растительных сообществ — злаковых и разнотравья.

Палинологические данные хорошо соотносятся со спорово-пыльцевым материалом, полученным из вмещающих пород, где были обнаружены тушки и фрагменты зайцев. Палиноспектры и данные радиоуглеродного датирования (32500 ± 340 кал. л. н.) указывают на то, что исследованные зайцы обитали в сухих и очень холодных условиях в период коношельского похолодания каргинского интерстадиала, который зафиксирован в интервале 33–30 тыс. л. н. [7]. В долине среднего течения р. Яны имелось широкое распространение открытых ландшафтов, вероятно, доминировали холодные степи с преобладанием ксерофитных видов, например таких, как *Artemisia* и *Caryophyllaceae*. Отмечались также злаково-разнотравные и осоково-разнотравные луга, участки без почвенно-растительного покрова. Местами были развиты участки ерниковых зарослей из кустарниковых видов берез, ольхи и ивы, кустарничков *Ericales* и травянистых сообществ.

Присутствие в палиноспектрах пыльцевых зерен *Rosaceae*, предположительно часть которых относится к криоксерофитному таксону *Dryadoideae*, и спор плаунка *Selaginella rupestris* подтверждают также данный факт, потому что наличие их в спорово-пыльцевых спектрах очень характерно для холодных периодов верхнего плейстоцена Сибири [8].

Установлено, что юнгуенские донские зайцы имели характерную белую окраску шерсти, и с большой долей вероятности они все погибли в холодное время года. Спорово-пыльцевые спектры из ЖКТ зайцев отражают особенности их зимнего питания, а палиноспектры из вмещающих отложений — особенности растительного покрова в холодный период года в местах их обитания в среднем течении р. Яна в конце каргинского времени.

Полученные результаты позволяют впервые уточнить местообитание донского зайца: ландшафты открытого типа, представленные холодными степями с доминированием ксерофитных сообществ, луга злаково-разнотравные и осоково-разнотравные, а также впервые уточнить особенности его зимнего рациона: он в основном состоял из травянистых растений (90.7–99.8%). Согласно литературным данным [9, 10] *L. tanaiticus*, по всей видимости, питался более грубыми кормами, чем современный *L. timidus*, так как у первого вида зубы крупнее и челюсти мощнее, чем у второго вида. Хотя в то время состав кормов донского зайца не был определен, но Н. Д. Оводов высказал предположение, что донские зайцы питались жесткой степной травянистой растительностью [11].

Выявленная особенность состава зимнего питания позднплейстоценовых зайцев вида *Lepus tanaiticus* коренным образом отличается от такового близкого им вида — современного зайца-беляка *L. timidus*, который зимой по всему ареалу преимущественно питается ветками и корой древесных растений и кустарников [12]. Частота поедания древесно-кустарниковых растений зайцем-беляком зимой обычно превышает 80%. Например, в Якутии она составляет до 83% [13], в Московской области — 95.3%; в Волжско-Камском крае — более 80% [14], в Северном Казахстане — до 80–90% и более [15]. В теплый период года *L. timidus*, как в тайге, так и в тундре, преимущественно питается травянистыми растениями. В снежный же период года даже в тундре этот заяц сохраняет зимний тип питания, концентрируясь исключительно в пойменных участках рек, заросших кустарниками [12]. Донские зайцы, будучи обитателями арктической степи, очевидно, были специализированы на питании травами во все сезоны года, и их вымирание было обусловлено изменениями климата в конце плейстоцена — начале голоцена, повлекшими за собой увеличение глубины снежного покрова, деградацию гиперзоны холодных степей и замену ее на тундровую и таежную зоны.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Палинологические исследования Павловой М. Р. выполнены за счет средств научно-исследовательского проекта № 122011800064-9 “Строение и ключевые этапы эволюции континентальной криолитозоны в неоплейстоцене и голоцене”. Работа остальных соавторов выполнена за счет средств госзаданий ИГАБМ СО РАН (Боескоров Г. Г.) и СВФУ (Чепрасов М. Ю., Новгородов Г. П.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие конфликтов интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Все этические стандарты и нормы авторами соблюдены. Получение разрешения на проведение исследования с участием людей и/или животных в данном исследовании не требовалось, так как в нем не принимали участие живые организмы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боескоров Г.Г., Чернова О.Ф., Шелчкова М.В. Первая находка замороженной мумии ископаемого донского зайца *Lepus tanaiticus* (Leporidae, Lagomorpha) из плейстоцена Якутии // Докл. РАН. Науки о Земле. 2023. Т. 510. № 1. С. 71–76.

2. *Sharko F., Slobodova N., Boulygina E., et al.* Ancient DNA of the Don-hares assumes the existence of two distinct mitochondrial clades in NorthEast Asia // *Genes*. 2023. V. 14. № 3. 700. P. 1–11.
3. Пыльцевой анализ / под ред. И. М. Покровской. М.: Гостеоиздат, 1950. 570 с.
4. *Faegri K., Iversen J.* Textbook of Pollen Analysis. Chichester: John Wiley & Sons, 1989. 328 p.
5. *Prager A., Theuerkauf M., Couwenberg J., et al.* Pollen and non-pollen palynomorphs as tools for identifying alder carr deposits: A surface sample study from NE-Germany // *Rev. Palaeobot. Palynol.* 2012. V. 186. P. 38–57.
6. *Barthelmes A., de Klerk P., Prager A., et al.* Expanding NPP analysis to eutrophic and forested sites: Significance of NPPs in a Holocene wood peat section (NE Germany) // *Rev. Palaeobot. Palynol.*, 2012. V. 186. P. 22–37. <https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2012.07.007>
7. Позднечетвертичные растительность и климаты Сибири и Российского Дальнего Востока (палинологическая и радиоуглеродная база) / под ред. П.М. Андерсон, А.В. Ложкина. Магадан: изд-во СВНЦ ДВО РАН, 2002. 369 с.
8. *Гутерман Р.Е.* История растительности северо-востока СССР в плейстоцене и плейстоцене. М.: Наука, 1985. 95 с.
9. *Гуреев А.А.* Зайцеобразные (Lagomorpha) // Фауна СССР. Млекопитающие. Т. 3. 1964. Вып. 10. С. 187–188.
10. *Аверьянов А.О.* Позднеплейстоценовый заяц *Lepus tanaiticus* (Lagomorpha, Leporidae) Сибири // Исследования по плейстоценовым и современным млекопитающим. СПб.: ЗИН РАН, 1995. С. 121–162 (Тр. ЗИН РАН. Т. 263).
11. *Оводов Н.Д.* Позднеплейстоценовые зайцы Сибири. К вопросу о филогенетической эволюции внутри рода *Lepus* // Проблемы археологии, этнографии, антропологии Сибири и сопредельных территорий (Мат-лы годовой сессии ИАиЭ СО РАН). Новосибирск: Изд-во ИАиЭ СО РАН, 2006. Т. XII. Ч. 1. С. 212–217.
12. *Соколов В.Е., Иваницкая Е.Ю., Груздев В.В., Гептнер В.Г.* Млекопитающие России и сопредельных регионов. Зайцеобразные. М.: Наука, 1994. 272 с.
13. *Тавровский В.А., Егоров О.В., Кривошеев В.Г. и др.* Млекопитающие Якутии. М.: Наука, 1971. 660 с.
14. *Наумов С.П.* Экология зайца-беляка. М.: МЛИП, 1947. 207 с.
15. *Слудский А.А., Бернштейн А.Д., Шубин И.Г., Страутман И.Г.* Млекопитающие Казахстана. Т. 2. Зайцеобразные. Алма-Ата: Наука, 1980. 236 с.

NEW DATA ON THE ECOLOGY OF THE FOSSIL DON HARE (*LEPUS TANAITICUS* [GUREEV, 1964])

**M. R. Pavlova^{a, #}, G. G. Boeskorov^b, M. Yu. Cheprasov^{c, d}, G. P. Novgorodov^e,
Presented by Academician of the RAS D. S. Pavlov**

^a *Melnikov's Permafrost Institute, Siberian Branch of RAS, Yakutsk, Russian Federation*

^b *Diamond and Precious Metals Geology Institute, Siberian Branch of RAS, Yakutsk, Russian Federation*

^c *M. K. Ammosov's North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russian Federation*

^d *Yakutsk Scientific Center,
Siberian Branch of RAS, Yakutsk, Russian Federation*

^e *E-mail: nigaer@yandex.ru*

A spore-pollen research of the contents of the gastrointestinal tracts and sediments containing frozen mummies of the fossil Don hare, discovered in the sediments of the Upper Pleistocene ice complex in the Verkhoyansk region of Yakutia, was carried out for the first time. Radiocarbon dating (C^{14}) revealed that the found hares lived during the Karginian Interstadial of the Late Pleistocene, 32.5 thousand years ago (calibrated date). As a result, the understanding of the extinct *Lepus tanaiticus* ecology has been expanded: this species lived in cold steppes dominated by xerophytic communities, as well as in grass-forb and sedge-forb meadows; unlike the modern mountain hare *L. timidus*, which feeds during winter time mainly on branches and bark of woody plants and shrubs, the diet of Don hares in winter previously consisted of herbaceous plants.

Keywords: extinct Don hare, *Lepus tanaiticus*, frozen mummies, enclosing sediments, gastrointestinal tract, spore-pollen method, ecology, Yakutia, Late Pleistocene.

УДК 599.42 57.063.7

НЕОБЫЧНО КРУПНЫЕ ВОСТОЧНЫЕ ДЛИННОКРЫЛЫ, *MINIOPTERUS FULIGINOSUS* – СМЕЩЕНИЕ ПРИЗНАКОВ ИЛИ РЕЗУЛЬТАТ ГИБРИДИЗАЦИИ?

© 2024 г. С. В. Крускоп^{1, 2, *}, С. С. Жукова³

Представлено академиком РАН В. В. Рожновым

Поступило 10.12.2023 г.

После доработки 11.01.2024 г.

Принято к публикации 12.01.2024 г.

В ходе изучения морфологической изменчивости длиннокрылов (*Miniopterus*) мы обнаружили, что экземпляры, происходящие из вьетнамской провинции Каобанг и определенные как *M. fuliginosus*, по размеру ближе к более крупному виду – *M. magnater*. Анализ митохондриальных генов определенно помещает эти экземпляры в первый вид. В то же время морфометрический анализ по 21 черепному размеру определенно ставит эти экземпляры ближе к *M. magnater* и показывает их отличия от *M. fuliginosus* из разных частей ареала. Мы предполагаем, что в горах севера Вьетнама и юга Китая *M. fuliginosus* в силу не известных пока обстоятельств занимает нишу более крупного вида. Однако недостаточные данные по ядерным маркерам допускают и гибридное происхождение этой популяции, заимствовавшей мтДНК другого вида.

Ключевые слова: рукокрылые, длиннокрылы, видовые границы, изменчивость, морфометрия, молекулярная генетика.

DOI: 10.31857/S2686738924020218, **EDN:** WDNMFZ

ВВЕДЕНИЕ

Длиннокрылы (*Miniopterus*) – род летучих мышей, широко распространенный в Старом Свете и Австралии. Из-за морфологического однообразия «традиционная» систематика принимала существование сравнительно небольшого числа видов (13–19), включая *Miniopterus schreibersii sensu lato*, ареал которого практически совпадал с ареалом рода [1, 2]. Использование молекулярно-генетического подхода показало, что видовое разнообразие рода было сильно недооценено. В настоящее время в составе рода признают около 40 видов [3], а в пределах бывшего *M. schreibersii* выделено несколько филогенетических линий видового уровня, большая часть которых не родственна собственно *M. schreibersii* [4]. Одну из таких линий представляет собой вос-

точный длиннокрыл, *M. fuliginosus*, ареал которого охватывает Южную, Юго-Восточную и Восточную Азию от востока Афганистана до Тайваня, Японии и южного Приморья [3, 5, 6].

В процессе работы с коллекционными материалами по длиннокрылам Юго-Восточной Азии выяснилось, что экземпляры из провинции Каобанг (северный Вьетнам), определенные как *M. fuliginosus*, по размерам черепа заметно крупнее своих конспецификов и приближаются к *M. magnater*. Оба вида присутствуют в фауне севера Индокитая и юга Китая [7], и филогенетические взаимоотношения между ними ясны не до конца [8]. Последние авторы указывают на значительное перекрытие размеров между видами, что несколько противоречит ранее опубликованным данным [9, 10].

Нами были проанализированы данные по двум митохондриальным и одному ядерным генам, чтобы подтвердить видовую идентификацию спорных особей и попытаться проверить предположение о гибридации. Также мы сравнили доступные выборки коллекционных экземпляров обоих видов, чтобы понять, действительно ли экземпляры из Каобанга не соответствуют видовой изменчивости *M. fuliginosus*.

¹Зоологический музей Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

²Совместный Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр, Ханой, Вьетнам

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

*E-mail: selysius@mail.ru

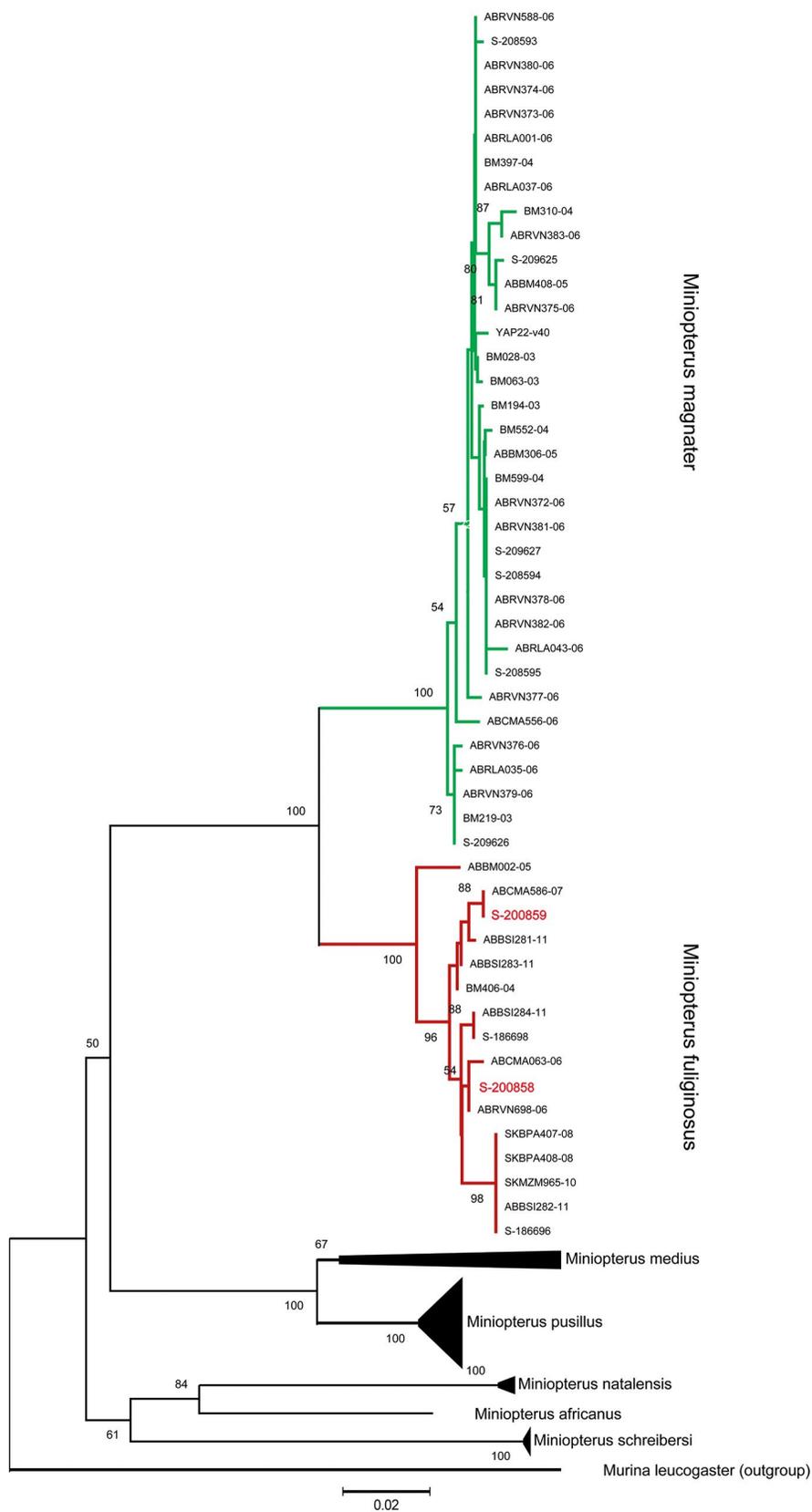


Рис. 1. Филогенетические взаимоотношения видов рода *Miniopterus* по данным анализа митохондриального гена *COI*; для данного гена доступна наиболее репрезентативная выборка последовательностей. Экземпляры из провинции Каобанг отмечены красным.

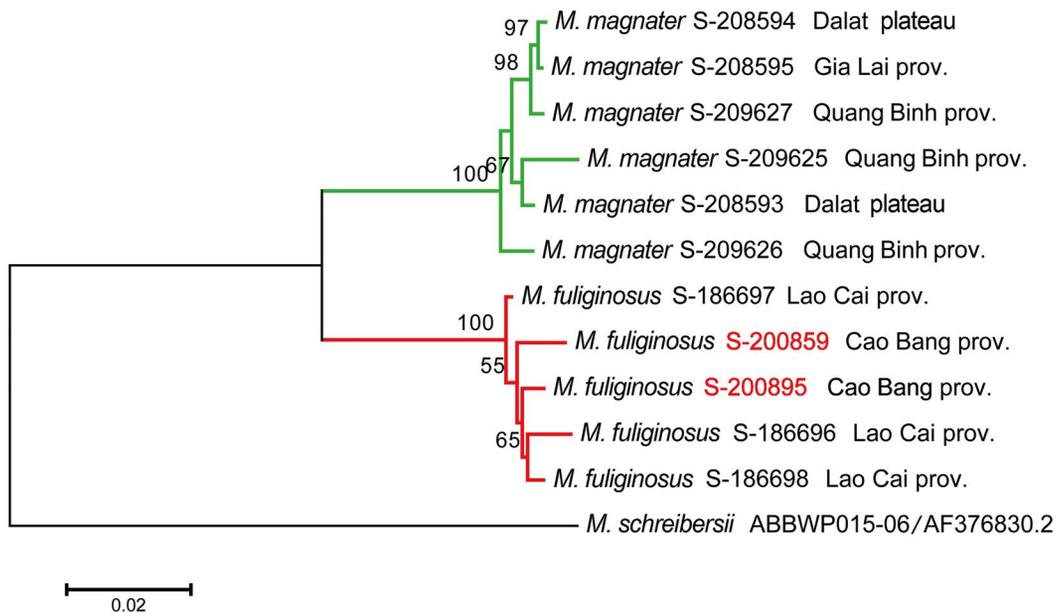


Рис. 2. Филогенетические взаимоотношения представителей рода *Miniopterus* по данным конкатената двух митохондриальных генов (*COI* и *cytb*). В анализ включены только оригинальные сиквенсы, кроме *M. schreibersii* из Италии, взятого в качестве внешней группы. Экземпляры из провинции Каобанг отмечены красным.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Геномную ДНК выделяли из фиксированных в этаноле проб тканей стандартным методом фенол-хлороформной депротеинизации [11]. Были получены последовательности митохондриальных генов *cytb* (1042 bp) и *COI* (652 bp), и ядерного гена *RAG2* (1234 bp). Последовательности праймеров взяты из опубликованных работ [12, 13, 14]. Реакция амплификации осуществлялась при следующих условиях: первичная денатурация – 94 °C в течение 3 мин.; затем 35 циклов, включающих денатурацию – 94 °C в течение 45 сек., отжиг с функцией touch down – 68–65 ° в течение 1 мин., синтез – 72 °C в течение 1. Конечный синтез осуществлялся при 72 °C в течение 7 мин. Опыты выполнены на приборе My Cycler BioRAD. Контроль амплификации проводили в 1% агарозном геле. Очистку продуктов ПЦР проводили с помощью набора Diatom DNA Clean-Up. Автоматическое секвенирование проведено на секвенаторе ABI PRISM 3500xl. Всего получено 35 оригинальных генетических последовательностей для 14 экземпляров длиннокрылов; еще 30 последовательностей двух генов были получены из ГенБанка и 57 последовательностей гена *COI* были взяты из базы BOLD. Номера использованных музейных экземпляров (обозначены литерой S) и номера ГенБанка и BOLD указаны на рис. 1–2.

Последовательности выровнены с помощью программ BioEdit v7.1.3. и SeqMan Pro v.7.1. [15, 16] и скорректированы вручную. Реконструкция филогенетических деревьев выполнена методами максимального правдоподобия (ML) при по-

мощи программ IQ-Tree и MEGA 10. Для определения достоверности полученной топологии ML использовали процедуру bootstrap с 500 репликами.

Для морфометрического анализа было измерено 178 экземпляров азиатских видов *Miniopterus*, в том числе 118 *M. fuliginosus* из разных частей видового ареала и 17 *M. magnater* из материковой Азии. После предварительного анализа из рассмотрения были исключены выборки мелких видов, а также очень крупные *M. cf. magnater* с Новой Гвинеи, сильно искажавшие результаты. В результате окончательный анализ были включены 132 экземпляра двух видов. Были использованы материалы Зоологического музея МГУ и Зоологического института РАН (Россия), Национального музея науки и природы и Музея префектуры Аомори (Япония), Национального музея естественных наук и Зоологического музея Тайбейского университета (Тайвань), Музея естественной истории Университета принца Сонгкла (Таиланд), Музея зоологических исследований Александра Кёнига и Зоологических коллекций Баварии (Германия). Были выполнены следующие краниальные измерения (сокращения указаны в скобках): наибольшая длина черепа (TL), кондилобазальная длина (CBL), кондилоканинная длина (CCL), мастоидная ширина черепа на уровне слуховых булл (MW), ширина черепной коробки (BCW), высота затылка от нижнего края мышелков до затылочно-теменного шва (OH), наименьшая ширина заглазничного сужения (POW), роstralная ши-

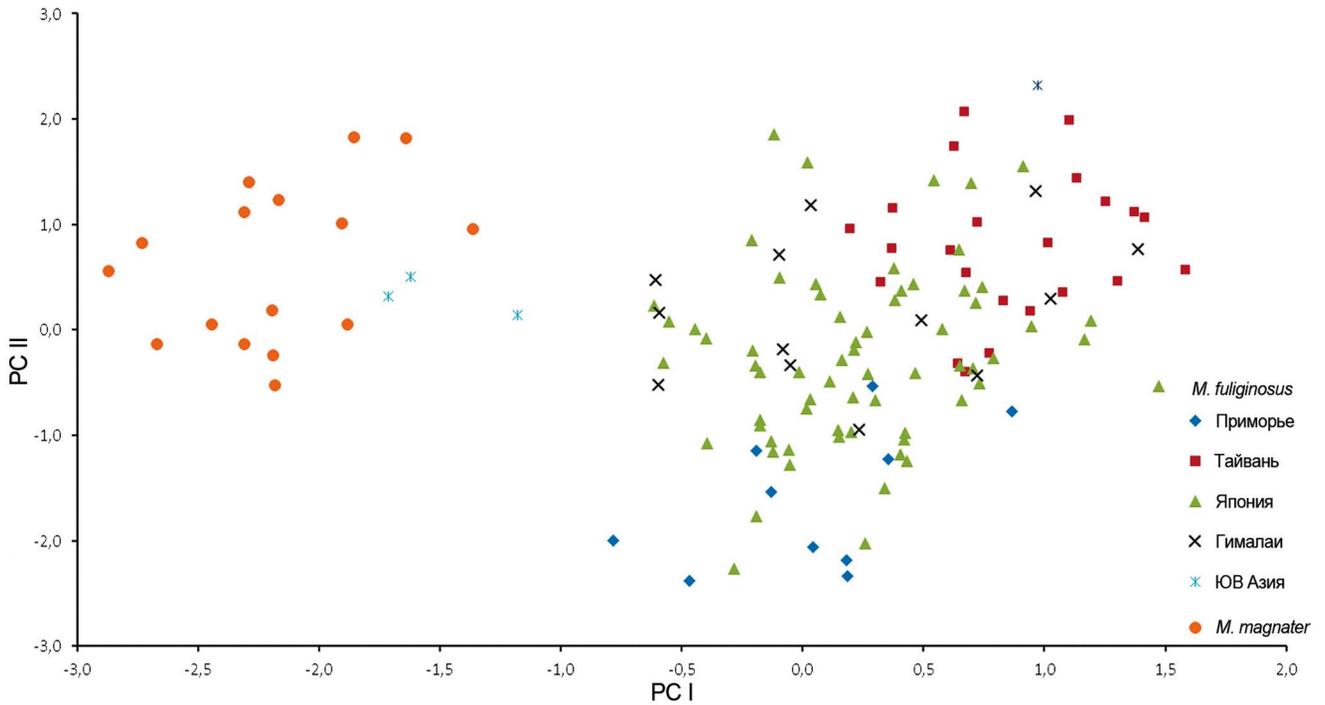


Рис. 3. Распределение 132 экземпляров длиннокрылов (*Miniopterus fuliginosus* и *M. magnater*) в пространстве первых двух факторов (главных компонент), рассчитанных для 21 черепного промера. Первый фактор отрицательно скоррелирован с общими размерами.

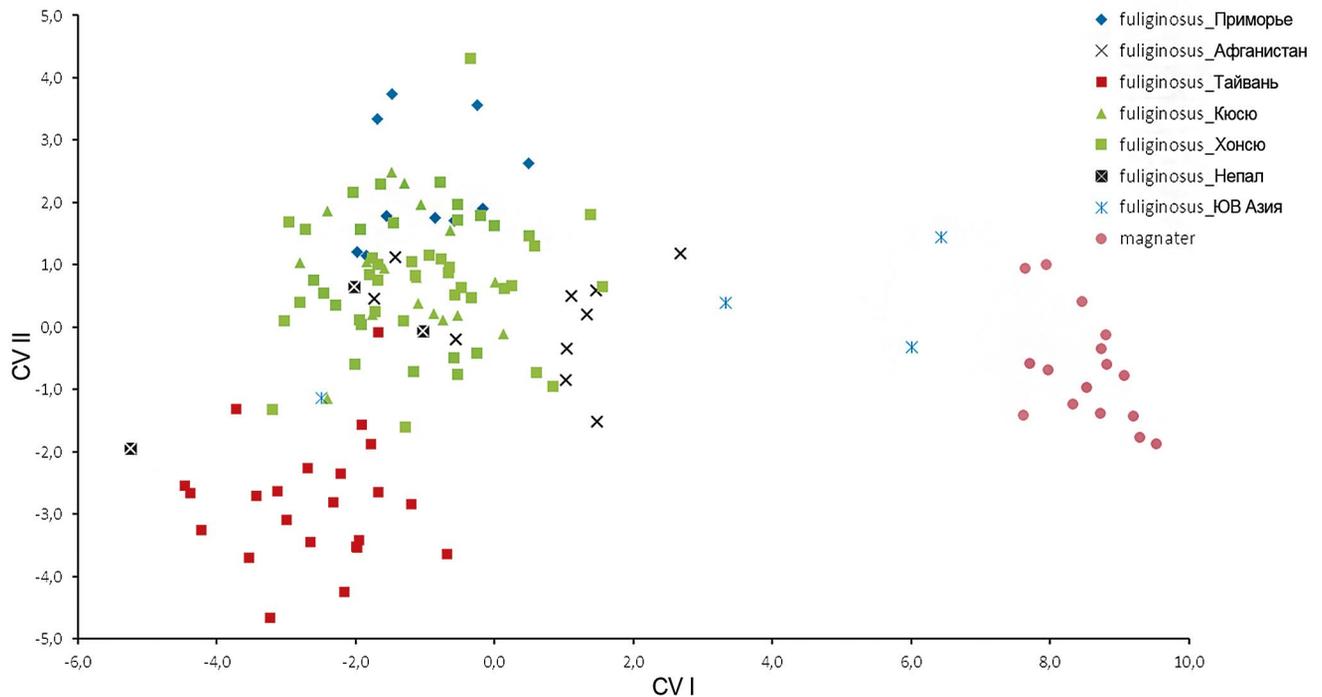


Рис. 4. Распределение 132 экземпляров длиннокрылов (*Miniopterus fuliginosus* и *M. magnater*) в пространстве первых двух канонических переменных, рассчитанных методом дискриминантного анализа для 21 черепного промера. Экземпляры из Непала (типичная территория *M. fuliginosus*) и Юго-Восточной Азии включены в анализ как «неопределенные».

рина на уровне подглазничного отверстия (RW), ростральная длина от подглазничного отверстия до альвеолы внешнего резца (RL), ширина меж-

ду наружными краями верхних клыков (С-С), ширина между наружными краями М3 (М3М3), длина С-М3 (СМ3), длина моляриформного ряда

Таблица 1. Квадраты дистанций Махаланобиса между центроидами шести обучающих выборок, использованных в анализе (5 выборок *M. fuliginosus* и 1 *M. magnater*; под диагональю) и достоверность различий между выборками (*p*-критерий; над диагональю), и квадраты дистанций Махаланобиса трех экземпляров из Каобанга от каждой из обучающих выборок

Обучающая выборка	1.	2.	3.	4.	5.	6.
1. Приморье	—	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2. Афганистан	16.621	—	0.000	0.000	0.000	0.000
3. Тайвань	32.089	24.347	—	0.000	0.000	0.000
4. Кюсю	13.249	12.603	16.273	—	0.006	0.000
5. Хонсю	9.394	9.169	17.245	3.493	—	0.000
6. <i>M. magnater</i>	104.162	68.405	128.529	105.270	90.081	—
S-200858	110.482	73.650	140.339	96.889	92.613	47.113
S-200859	42.961	47.762	73.201	60.403	50.103	57.422
S-200897	80.377	57.968	98.958	74.768	67.681	23.756

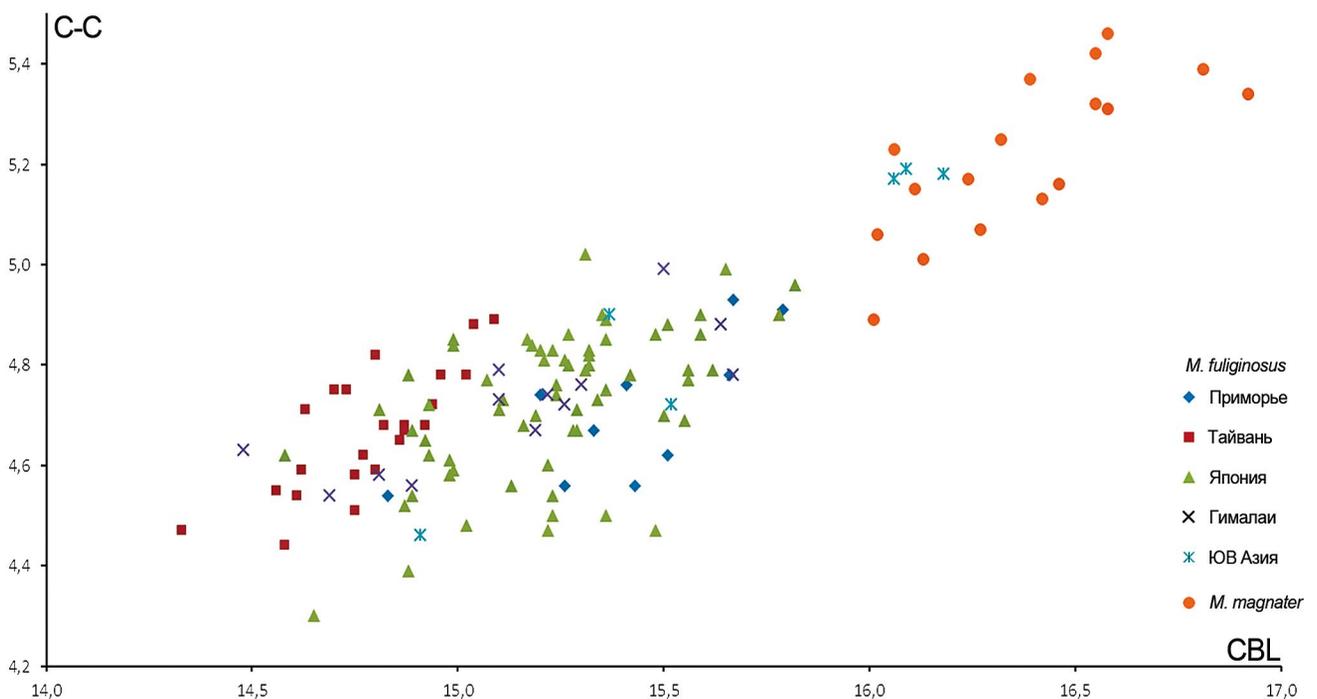


Рис. 5. Сравнение 134 экземпляров длинокрылов (*Miniopterus fuliginosus* и *M. magnater*) по значениям двух черепных промеров: кондилобазальной длины черепа (CBL) и ширины между внешними краями клыков (С-С). Три экземпляра из провинции Каобанг соответствуют промерам *M. magnater*.

верхней челюсти (P4M3), длина основания цингулюма верхнего клыка (С), длина костного нёба от переднего края клыков (Pal), ширина задней части костного нёба (PalW), ширина между внешними краями гленоидных ямок (GIW), ширина между внешними краями затылочных мыщелков (ConW), длина зубного ряда нижней челюсти (см³), длина нижней челюсти от альвеолы i¹ до заднего края суставного отростка (MdL), высота нижней челюсти до верхушки венечного отростка (MdH).

Для оценки характера изменения количественных признаков был проведен анализ главных компонент (PC) и дискриминантной функции (DF) с использованием соответствующих модулей STATISTICA для Windows версии 7.0. Обучающий набор для расчета квадратов дистанций Махаланобиса и апостериорных вероятностей в рамках DF-анализа включал пять географических выборок *M. fuliginosus* “Приморье”, “Афганистан”, “Тайвань”, “Кюсю”, “Хонсю”) и выборку материковых *M. magnater*. Часть экземпляров, в том числе обсуж-

даемые экземпляры из провинции Каобанг, были включены в анализ как “неопределенные”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как и в ранее опубликованных работах [8], митохондриальные гены хорошо разделяют *M. fuliginosus* и *M. magnater* (рис. 1, 2): средние дистанции между кладами составили 6.0% для *cytb*, 6.85% для *COI* и 6.44% для конкатената обоих генов. При этом экземпляры из провинции Каобанг однозначно определяются как *M. fuliginosus*.

Единственный ядерный ген, *RAG2*, к сожалению, не разделяет обсуждаемые виды, формируя единую хорошо поддержанную кладу азиатских длиннокрылов (включающую также *M. medius* и *M. australis*). Очевидно, что для получения приемлемой филогенетической реконструкции необходимо использовать несколько ядерных ДНК-маркеров.

РС-анализ показывает неплохое разделение *M. fuliginosus* и *M. magnater* по первому фактору (рис. 3). Сумма значений общей изменчивости первых двух факторов превышает 79%. На ненормализованных данных первый фактор скоррелирован с большинством размерных параметров, на нормализованных (*varimax normalized*) — в первую очередь, с длинами зубных рядов. Почти все экземпляры *M. fuliginosus* образуют единое облако. Размещение географических выборок в нем неравномерно, часть их не перекрывают друг а по одному или двум факторам, что свидетельствует о наличии определенной географической изменчивости, нуждающейся в дальнейшем изучении. Выборка *M. magnater* хорошо обособлена, и экземпляры из провинции Каобанг определенно тяготеют к ней, а не к *M. fuliginosus*.

Данные дискриминантного анализа разделяют *M. magnater* и *M. fuliginosus* ожидаемо лучше (рис. 4): квадраты дистанций Махаланобиса между ними в 3–11 раз больше, чем между центроидами разных выборок *M. fuliginosus* (табл. 1). При этом сами географические выборки последнего вида также демонстрируют определенные различия; наиболее обособленной оказывается выборка с о. Тайвань. Недостовверными ($p > 0.001$) оказались различия только между выборками с островов Хонсю и Кюсю. Из трех измеренных экземпляров из провинции Каобанг два ассоциируются с *M. magnater*, хоть и лежат на графике за пределами распределения особей этого вида, тогда как третий по значениям квадратов дистанций Махаланобиса занимает промежуточное положение (см. табл. 1).

Практически по всем абсолютным значениям черепных промеров измеренные экземпляры из Каобанга укладываются в изменчивость *M. magnater* и несколько крупнее *M. fuliginosus* (рис. 5). Из 21 промера

только значения четырех (МЗМЗ, СМЗ, Р4МЗ и МdL) оказались чуть ниже минимальных значений для *M. magnater*. В то же время наибольшая и кондиллобазальная длины черепа и длина зубного ряда экземпляров из Каобанга превышают максимальные значения для *M. fuliginosus* и больше средних значений для этого вида на 6.6–7.0, 6.0–6.8 и 6.3–8.9%, соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Miniopterus fuliginosus и *M. magnater* крайне сходны морфологически, различаясь, по сути, только размерами [9, 10] и генетически [8, 17]; различия в форме козелка [17] малы и не вполне надежны. Тем не менее наши данные показывают, что два вида вполне можно различать по морфометрии при наличии достаточных обучающих выборок. Единственным исключением среди имевшихся в нашем распоряжении материалов оказались экземпляры с горы Фиаок в провинции Каобанг. Примечательно, что эти экземпляры, по абсолютным линейным размерам определенно относимые к *M. magnater*, по результатам морфометрического анализа все же не идентичны ему, а занимают в некотором смысле промежуточное положение. Таким образом, животные из Каобанга оказываются определенно принадлежащими к *M. fuliginosus* по митохондриальной ДНК и более близкими к *M. magnater* по морфометрии. Эта ситуация может быть объяснена либо смещением признаков у конкретной популяции, либо ее гибридным происхождением (заимствованием митохондриальной ДНК у *M. fuliginosus*).

Ограниченная гибридизация с заимствованием мтДНК не единична среди рукокрылых [18, 19]. С другой стороны, у *Miniopteridae* она пока не описана; два близкородственных вида *Miniopterus* в Средиземноморье не демонстрируют потока генов в зоне симпатрии [20]. Однако малый объем полученных данных по ядерным генам не позволяет подтвердить или опровергнуть предположение о заимствовании митохондриальной ДНК. Если в дальнейшем новые данные подтвердят эту версию, это станет первым подобным документированным случаем для семейства *Miniopteridae*.

Неоднозначные данные по морфометрии (при вполне видимых абсолютных размерных различиях) говорят в пользу версии о смещении признаков в сторону увеличения размеров у восточных длиннокрылов. В работе [Li et al., 8] упомянуто заметное перекрывание размеров черепа между *M. fuliginosus* и *M. magnater* в Китае и соседних частях Вьетнама. Можно предположить, что такие необычно крупные *M. fuliginosus* присутствуют в низкогорьях южных провинций Китая. Такого смещения признаков в сторону увеличения размера было бы логичнее ожидать в регионах, далеких от зоны контакта *M. fuliginosus* и *M. magnater*. Остается предположить (если мы все же имеем дело

не с гибридизацией), что в горах провинции Каобанг (и, вероятно, на юго-востоке материкового Китая) *M. fuliginosus* по каким-то причинам занимает нишу именно *M. magnater*, соответственно, приближаясь по размерам к последнему. Очень слабая изученность экологии обоих видов не позволяет делать более детальные предположения.

Ситуация с экземплярами из Каобанга наглядно показывает, что, хотя в общем случае виды длиннокрылов и можно разделять методами морфометрии, морфологические определения (а соответственно, представления о границах ареалов и биотопических предпочтениях) требуют проверки молекулярно-генетическими методами. В любом случае, описанное перекрытие размеров двух обсуждаемых видов в Китае [8] не является типичным и связано либо с неверно определенными *M. magnater* с заимствованной мтДНК, либо ограниченным числом популяций *M. fuliginosus*, выходящим за рамки обычной размерной изменчивости своего вида.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы крайне признательны администрации Института проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН и Российско-Вьетнамского совместного научного и технологического тропического центра за возможность работы с материалами с территории Вьетнама, хранителям и кураторам всех перечисленных научных коллекций за предоставление доступа к коллекционным материалам. Работа выполнена на материальной базе кафедры зоологии позвоночных биологического факультета и Зоологического музея МГУ им. М. В. Ломоносова при содействии администрации этих подразделений и соответствует теме НИР Зоологического музея № 121032300105-0.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00017).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Koopman K.F. Chiroptera: Systematics, vol. VIII of Mammalia*, New York: Walter de Gruyter, 1994. P. 60.
2. *Simmons N.B. Order Chiroptera, in Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference. 3rd Edit. V. 1.* Wilson D.E., Reeder D.M. Eds., Baltimore Johns Hopkins Univ. Press, 2005.
3. *Ibáñez C. and Juste J. Family Miniopteridae (Long-fingered Bats), in Handbook of the Mammals of the World. V. 9: Bats*, Wilson D. E. and Mittermeier R. A. Eds., Barcelona: Lynx Edicions, 2019.
4. *Appleton B. R., McKenzie J. A., Christidis L. Molecular systematics and biogeography of the bent-wing bat complex *Miniopterus schreibersii* (Kuhl, 1817) (Chiroptera: Vespertilionidae).* Mol. Phyl. Evol., 2004. V. 31. № 2, P. 431–439.
5. *Endo K., Iida K., Nunome M., et al. Phylogeography of *Miniopterus fuliginosus* (Chiroptera) with special reference to Jeju Island, South Korea, Mammalia, 2019. V. 83. № 6, P. 610–614.*
6. *Тунов М. П., Крускоп С. В., Орлова М. В. Рукокрылые Дальнего Востока России и их эктопаразиты.* М.: Перо, 2021.
7. *Wilson D. E. Order Chiroptera, in A guide to the Mammals of China*, Smith A.T., Xie Y., Eds., Princeton: Princeton Univ. Press, 2008.
8. *Li S., Sun K., Lu G., et al. Mitochondrial genetic differentiation and morphological difference of *Miniopterus fuliginosus* and *Miniopterus magnater* in China and Vietnam,* Ecol. Evol., 2015. V. 5. № 6. P. 1214–1223.
9. *Maeda K. Studies on the classification of *Miniopterus* in Eurasia, Australia, and Melanesia, Honyurui Kagaku (Mammalian Science), 1982. Suppl. 1. P. 1–176.*
10. *Kruskop S.V. Bats of Vietnam. Checklist and an identification manual. 2nd edition, revised and supplemented, Biodiversity of Vietnam series.* Moscow: KMK Ltd., 2013.
11. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning – A Laboratory Manual.* N. Y.: Cold Spring Harbour Lab. Press, 1989, 2nd ed.
12. *Baker R.J., Porter C.A., Patton J.C., Van Den Bussche T.A. Systematics of bats of the family Phyllostomidae based on Rag2 DNA sequences, Occas. Pap. Mus. Texas Tech. Univ., 2000. V. 202. P. 1–16.*
13. *Artyushin I.V., Kruskop S.V., Lebedev V.S., Bannikova A.A. Molecular phylogeny of Serotines (Mammalia, Chiroptera, *Eptesicus*): evolutionary and taxonomical aspects of the *E. serotinus* species group,* Biol. Bull., 2018. V. 45, № 5, pp. 469–477.
14. *Ivanova N.V., Clare E.L. and Borisenko A.V. DNA barcoding in Mammals, in DNA Barcodes: Methods and Protocols*, Kress W.J. and Erickson D.L., Eds., NJ: Humana Press, 2012.
15. *Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Nucleotide, 1999, V. 41, P. 95–98.*
16. *Burland T.G. DNASTAR's lasergene sequence analysis software, Methods Mol. Biol., 1999. V. 132, P. 71–91.*
17. *Kusuminda T., Mannakkara A., Ukuwela K.D.B., et al. DNA barcoding and morphological analyses reveal a cryptic species of *Miniopterus* from India and Sri Lanka, Acta Chiropt., 2022, V. 24, № 1, P. 1–17.*
18. *Furman A., Çoraman E., Çelik Y. E. et al. Cytonuclear discordance and the species status of *Myotis myotis* and *Myotis blythii* (Chiroptera), Zoologica Scripta, 2014, V. 43, № 6, P. 549–561.*
19. *Çoraman E., Dietz C., Hempel E., et al. Reticulate evolutionary history of a Western Palaearctic Bat complex explained by multiple mtDNA introgressions in secondary contacts, J. Biogeogr., 2019, V. 46, P. 343–354.*
20. *Bilgin R., Gürün K., Maracı Ö., et al. Syntopic occurrence in Turkey supports separate species status for *Miniopterus schreibersii schreibersii* and *Miniopterus schreibersii pallidus* (Mammalia: Chiroptera), Acta Chiropt., 2012. V. 14, № 2, P. 279–289.*

ARE ABNORMALLY LARGE EASTERN BENT-WING BATS, *MINIOPTERUS FULIGINOSUS* REPRESENT FEATURE SHIFT OR RESULT OF HYBRIDISATION?

S. V. Kruskop^{a, b, #}, S. S. Zhukova^c

Presented by Academician of the RAS V.V. Rozhnov

^a*Zoological Museum of Moscow M.V. Lomonosov State University, Moscow, Russian Federation*

^b*Joint Russian-Vietnamese Tropical Scientific Research and Technology Center, Hanoi, Vietnam*

^c*Biological faculty of Moscow M.V. Lomonosov State University, Moscow, Russian Federation*

[#]*E-mail: selysius@mail.ru*

During a study of morphological variation in bent-wing bats (*Miniopterus*), we found that specimens originating from the Cao Bang province of Vietnam, identified as *M. fuliginosus*, were closer in size to the larger species, *M. magnater*. Mitochondrial gene analysis clearly places these specimens in the former species. At the same time, morphometric analysis of 21 cranial measurements definitely puts these specimens closer to *M. magnater* and shows their differences from *M. fuliginosus* samples from different parts of the species range. We assume that in the low mountains of northern Vietnam and southern China, *M. fuliginosus*, due to as yet unknown circumstances, occupies the niche of a larger species. However insufficient data on nuclear markers also assume a hybrid origin of this population, which borrowed the mtDNA of another species..

Keywords: chiroptera, bent-wing bats, species delimitation, variability, morphometry, molecular genetics.

