

ISSN 2686-7389

Том 516

Май–Июнь 2024



ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ



НАУКА
— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 516, 2024

Гены фитоинсинтаз (*StPSY1*, *StPSY2*, *StPSY3*) *Solanum tuberosum* L. участвуют в ответе растений картофеля на холодовой стресс

А. В. Кулакова, А. В. Щенникова, Е. З. Кочиева 3

Влияние хирургического вмешательства в полость носа крыс на условный рефлекс пассивного избегания и уровень моноаминов в гипоталамусе

А. Г. Королев, И. В. Кастыро, А. Н. Иноземцев, А. В. Ламанов 10

Кубинский ара (*Ara tricolor*) в верхнем плейстоцене Западной Кубы

Н. В. Зеленков 15

Аминокислотный фонд сыворотки крови европейских мигрирующих видов рукокрылых: *Vespertilio murinus* (Linnaeus, 1758) и *Pipistrellus nathusii* (Keyserling et Blasius, 1839), обитающих на Урале

Л. А. Ковальчук, В. А. Мищенко, Л. В. Черная, В. Н. Большаков 20

Plecotus macrobullaris sarmaticus subsp. nov. (Vespertilionidae, Chiroptera) из раннего плейстоцена Крыма

А. В. Лопатин 26

Мембраносвязанная ферри-форма гемоглобина в ядерных эритроцитах морского ерша (*Scorpaena porcus*, Linnaeus, 1758)

А. А. Солдатов, Н. Е. Шалагина, В. Н. Рычкова, Т. А. Кухарева 34

Две филогенетические когорты главного нуклеокапсидного белка NP и их связь с кругом хозяев у вирусов гриппа А

А. И. Чернышова, О. П. Жирнов 40

Оценка уровня клинически значимых микроРНК на основании тотального клеточного пула РНК алгоритмами машинного обучения

Я. В. Соловьев, А. С. Евпак, А. А. Кудряева, А. Г. Габиров, А. А. Белогуров 46

Частотно-зависимая вариабельность времени прохождения пульсовой волны. Пилотное исследование

А. А. Гриневич, Н. К. Чемерис 55

Бинарная протонная терапия карциномы Эрлиха с использованием адресных наночастиц золота

М. В. Филимонова, Д. Д. Колманович, Г. В. Тихоновский, Д. С. Петруня, П. А. Котельникова, А. А. Шитова, О. В. Солдатова, А. С. Филимонов, В. А. Рыбачук, А. О. Косаченко, К. А. Николаев, Г. А. Демьякин, А. А. Попов, М. С. Савинов, А. Л. Попов, И. В. Зелепукин, А. А. Липенгольц, К. Е. Шпакова, А. В. Кабашин, С. Н. Корякин, С. М. Деев, И. Н. Завестовская 59

Гибридные белки, содержащие антигенный эпитоп и тиоредоксин для *in vitro* стимуляции CD4⁺ TCR⁺ Jurkat Т-клеток

И. А. Ишина, М. Ю. Захарова, И. Н. Курбацкая, А. Э. Мамедов, А. А. Белогуров, Ю. П. Рубцов, А. Г. Габиров 64

CONTENTS

Vol. 516, 2024

<i>Solanum tuberosum</i> L. Phytoene Synthase Genes (<i>STPSY1</i> , <i>STPSY2</i> , <i>STPSY3</i>) Participate in the Potato Plant's Response to Cold Stress <i>A. V. Kulakova, A. V. Shchennikova, & E. Z. Kochieva</i>	3
The Effect of Surgical Procedure in the Nasal Cavity in Rats on the Passive Avoidance Conditioning and the Level of Monoamines in the Hypothalamus <i>A. G. Korolev, I. V. Kastyro, A. N. Inozemtsev, & A. V. Latanov</i>	10
Cuban Macaw (<i>Ara Ticolor</i>) in the Upper Pleistocene of Western Cuba <i>N. V. Zelenkov</i>	15
Amino Acid Fund of Blood Serum of European Migrating Species of Chiroptera: <i>Vespertilio murinus</i> (Linnaeus, 1758) and <i>Pipistrellus nathusii</i> (Keyserling et Blasius, 1839) of the Ural Fauna <i>L. A. Kovalchuk, V. A. Mishchenko, L. V. Chernaya, & V. N. Bolshakov</i>	20
<i>Plecotus macrobullaris sarmaticus</i> subsp. nov. (Vespertilionidae, Chiroptera) from the Early Pleistocene of Crimea <i>A. V. Lopatin</i>	26
Membrane-bound Ferriform Hemoglobin in Nuclear Erythrocytes of the Sea Ruff (<i>Scorpaena porcus</i> , Linnaeus, 1758) <i>A. A. Soldatov, N. E. Shalagina, V. N. Rychkova, & T. A. Kukhareva</i>	34
Two Phylogenetic Cohorts of the Nucleocapsid Protein NP and Their Correlation with the Host Range of Influenza A Viruses <i>A. I. Chernyshova, & O. P. Zhirnov</i>	40
Evaluation of Clinically Significant miRNAs Level by Machine Learning Approaches Utilizing Total Transcriptome Data <i>Ya. V. Solovev, A. S. Evpak, A. A. Kudriaeva, A. G. Gabibov, & A. A. Belogurov, Jr.</i>	46
Frequency-Dependent Variability of Pulse Wave Transit Time. Pilot Study <i>A. A. Grinevich, & N. K. Chemeris</i>	55
Binary Proton Therapy of Ehrlich Carcinoma Using Targeted Gold Nanoparticles <i>M. V. Filimonova, D. D. Kolmanovich, G. V. Tikhonowski, D. S. Petrunya, P. A. Kotelnikova, A. A. Shitova, O. V. Soldatova, A. S. Filimonov, V. A. Rybachuk, A. O. Kosachenko, K. A. Nikolaev, G. A. Demyashkin, A. A. Popov, M. S. Savinov, A. L. Popov, I. V. Zelepukin, A. A. Lipengolts, K. E. Shpakova, A. V. Kabashin, S. N. Koryakin, S. M. Deyev, & I. N. Zavestovskaya</i>	59
Antigenic Peptide–Thioredoxin Fusion Chimeras for <i>in Vitro</i> Stimulus of CD4 ⁺ TCR ⁺ Jurkat T-cells <i>I. A. Ishina, M. Y. Zakharova, I. N. Kurbatskaia, A. E. Mamedov, A. A. Belogurov, Jr., Y. P. Rubtsov, & A. G. Gabibov</i>	64

УДК 577.214.5:575.174.015.3

ГЕНЫ ФИТОИНСИНТАЗ (*StPSY1*, *StPSY2*, *StPSY3*) *SOLANUM TUBEROSUM* L. УЧАСТВУЮТ В ОТВЕТЕ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ НА ХОЛОДОВОЙ СТРЕСС

© 2024 г. А. В. Кулакова^{1,*}, А. В. Щенникова¹, Е. З. Кочиева¹

Представлено академиком РАН В.О. Поповым

Поступило 28.12.2023 г.

После доработки 25.01.2024 г.

Принято к публикации 30.01.2024 г.

Охарактеризована структура и филогения генов *StPSY1*, *StPSY2* и *StPSY3*, кодирующих фитоинсинтазы *Solanum tuberosum* L. Исследована экспрессия данных генов в проростках картофеля в ответ на воздействие холодового стресса в темновой фазе суточного цикла как имитации ночного похолодания. Выявлено, что все три гена активируются при снижении температуры, и наибольшая реакция наблюдается для *StPSY1*. Впервые показана реакция гена *StPSY3* на холодовый стресс и фотопериод. Проведен поиск *цис*-регуляторных элементов в области промотора и 5'-UTR генов *StPSY* и показано, что регуляция всех трех генов связана с реакцией на свет. Высокий уровень низкотемпературной активации гена *StPSY1* может быть связан с присутствием *цис*-элементов, ассоциированных с чувствительностью к холоду и АБК.

Ключевые слова: картофель, *Solanum tuberosum*, биосинтез каротиноидов, фитоинсинтаза PSY, холодовый стресс

DOI: 10.31857/S2686738924030019, **EDN:** VUVRYO

Каротиноиды являются важными компонентами фотосинтеза и фотозащиты растений. Ферментативное расщепление данных метаболитов приводит к образованию апокаротиноидов, в том числе фитогормонов (абсцизовой кислоты (АБК) и стриголактонов), критичных для онтогенеза и иммунитета растения. Кроме того, каротиноиды, накапливаясь в пластидах запасующих органов, являются аттрактантами, придающими цветкам, плодам и зернам яркую (красную, оранжевую, желтую) окраску, тем самым способствуя опылению цветков и распространению семян [1].

Ключевым ферментом биосинтеза каротиноидов является фитоинсинтаза PSY, которая локализуется в стромах и/или пластоглобулах пластид и катализирует первую стадию биосинтеза каротиноидов с образованием С40-фитоина [2, 3]. В геноме большинства видов растений показано существование трех

паралогичных генов, кодирующих, соответственно, три изофермента — PSY1, PSY2 и PSY3, тогда как для ряда видов выявлено только два (например, морковь *Daucus carota*, Apiaceae) или один (*Arabidopsis thaliana* L., Brassicaceae) ген PSY [3–7]. Ген *PSY1* впервые идентифицирован при исследовании плодов томата *Solanum lycopersicum* L. [4]. Позднее, также у томата, был найден гомологичный ген *PSY2* с преимущественной экспрессией в листьях [5]. Ген *PSY3* впервые упоминается в исследованиях риса *Oryza sativa* L. и кукурузы *Zea mays* L. [6, 7], и в настоящее время известен и у других видов растений, включая томат и люцерну *Medicago truncatula* L. [3]. Показано, что *PSY3*, в отличие от *PSY1* и *PSY2*, экспрессируется в растении в следовых количествах, однако активируется в вегетативной ткани при воздействии нескольких типов стрессовых факторов: засуха, избыток соли, повышенная температура, грибная инфекция или дефицит фосфатов [3, 6–8].

Изоферменты PSY1 и PSY2 ассоциируют с тканеспецифичным синтезом каротиноидов. Экспрессия *PSY2* больше свойственна фотосинтезирующим органам, тогда как для *PSY1* характерна преимущественная активность в запасующих органах, но и в фотосинтезирующей ткани *PSY1* действует, поддерживая, в частности, темновую фазу

¹Федеральное государственное учреждение “Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук”, Москва, Россия

*e-mail: kulakova_97@mail.ru

фотосинтеза [8, 9]. Светочувствительность регуляции обоих генов отражается на суточных колебаниях уровня их экспрессии [8, 9]. Роль *PSY3* связывают со стрессовой реакцией растения через стимулирование синтеза АБК и стриголактонов [3, 6, 7]. При замалчивании *PSY1* в плодах томата полностью отсутствуют каротиноиды, тогда как в случае замалчивания (на 70%) *PSY2* и *PSY3* заметно снижено содержание фитоина, фитофлуина и ξ -каротина (предшественники цветных каротиноидов); данные факты подтверждают ведущую роль *PSY1* в каротиногенезе запасующих органов и возможное соучастие в нем *PSY2* и *PSY3* [9]. Замалчивание *PSY3* приводит к значительному падению содержания апокаротиноидов в корнях *M. truncatula*, что поддерживает идею об участии *PSY3* в обеспечении адаптивности растения [3].

Считается, что гены *PSY1* и *PSY2* возникли в результате нескольких событий полногеномных дупликаций цветковых растений [3, 8, 10]. Гипотезы о происхождении *PSY3* разнятся. С одной стороны, предполагается более раннее происхождение *PSY1* и *PSY2* и последующее специфическое событие дупликации, приведшее к появлению *PSY3*, являвшееся независимым у однодольных и двудольных видов [10]. С другой стороны, *PSY3* считается более древним, чем *PSY1* и *PSY2*, поскольку его гомологи обнаружены и у однодольных, и у двудольных видов, вплоть до *Amborella trichopoda* Baill. — самого базального покрытосеменного растения [3, 8].

Как упоминалось выше, каротиноиды представляют собой важные компоненты защиты растений от стрессовых факторов [1]. У картофеля *Solanum tuberosum* L., значимой сельскохозяйственной культуры, для которой вопрос стрессоустойчивости занимает важное место, исследования каротиногенеза ограничены анализом клубней на содержание каротиноидов и, иногда, экспрессию генов фитоинсинтаз. В частности, показана сортовая специфичность содержания каротиноидов и уровня экспрессии генов *PSY1* и *PSY2* в клубнях [11]. Также, определена динамика изменения содержания каротиноидов и уровня экспрессии генов *PSY1*, *PSY2* и *PSY3* в процессе низкотемпературного хранения клубней [12]. Показано, что при продолжительном низкотемпературном хранении клубней уровень транскриптов всех трех генов сначала снижается, а затем, к моменту выхода клубней из состояния физиологического покоя, начинает расти, что, вероятно, обусловлено необходимостью синтеза фитогормонов (АБК, стриголактоны) для прорастания глазков и дальнейшего развития побегов [12].

Целью данного исследования стали гены *PSY1*, *PSY2* и *PSY3* картофеля *S. tuberosum* и их ответ на воздействие одного из основных стрессовых факторов — холод (3°C). Помимо этого, реакция на имитацию ночного похолодания была интересна также с учетом предполагаемых суточных изменений уровня

экспрессии данных генов в ответ на наличие/отсутствие освещения.

Используя данные генбанка NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), включая аннотацию генов *S. tuberosum* и поиск по гомологии с известными генами *PSY1*, *PSY2* и *PSY3* *S. lycopersicum*, были извлечены последовательности гомологичных генов *StPSY1* (NCBI Gene ID: 102593756), *StPSY2* (102589336) и *StPSY3* (102603193) картофеля.

Сравнительный анализ кодируемых генами аминокислотных последовательностей показал, что *StPSY1* и *StPSY2* идентичны друг другу на 79% (100% покрытие последовательностей при сравнении) и *StPSY1/StPSY2* с *StPSY3* — на 69%/65% (покрытие 71%/74%). Все три последовательности содержат фитоинсинтазный домен (PLN02632) в положении 75—406 (*StPSY1*, размер белка 412 аа), 92—430 (*StPSY2*, 438 аа), 63—380 (*StPSY3*, 384 аа). Сравнение последовательностей *StPSY1* и *StPSY2* выявило отсутствие на N-конце *StPSY1* мотивов FPSP и RQEWNFGFLNADLRYSC (рис. 1а), что является основным различием белков. Предсказанный согласно [13] функционально значимый сайт отщепления N-концевого транзитного пептида, ответственного за пластидную локализацию *StPSY*, может находиться в положениях V61/R62 (*StPSY1*), V85/Q86 (*StPSY2*) и V55/Q56 (*StPSY3*).

Филогенетический анализ, проведенный с использованием гомологичных белков из других видов растений, позволил построить дендрограмму, где четко прослеживается формирование гомологами *PSY1* и *PSY2* видов Пасленовых отдельных кластеров, сестринскую ветвь к которым образует единственный белок *PSY A. thaliana* (рис. 1б). При этом гомологи *PSY3* формируют отдельный кластер, занимающая базовую позицию в дендрограмме (рис. 1б).

В совокупности, полученные структурно-филогенетические данные свидетельствуют в пользу наиболее древнего происхождения гена *PSY3* среди генов фитоинсинтаз, в согласии с предположением, выдвинутым ранее [3, 10]. С учетом известного участия изофермента *PSY1* в синтезе каротиноидов в тканях репродуктивных органов (цветков, плодов, зерен) можно предположить, что ген *StPSY1* возник эволюционно позднее гена *StPSY2*, возможно, в результате дупликации последнего с изменением регуляторных областей и 5'-концевой последовательности гена и, как следствие, приобретением им новых функций. Размер гена *StPSY1* (4731 пн, 7 экзонов) больше, чем *StPSY2* (4020 пн, 7 экзонов), и оба гена по размеру существенно превышают *StPSY3* (3440 пн, 6 экзонов). В пользу более раннего происхождения *StPSY3* также свидетельствует отсутствие у гена нетранслируемой области 5'-UTR, предполагающее упрощенную регуляцию гена [14], и наличие такой области в случае *StPSY1* и *StPSY2* (1635 и 1074 пн соответственно).

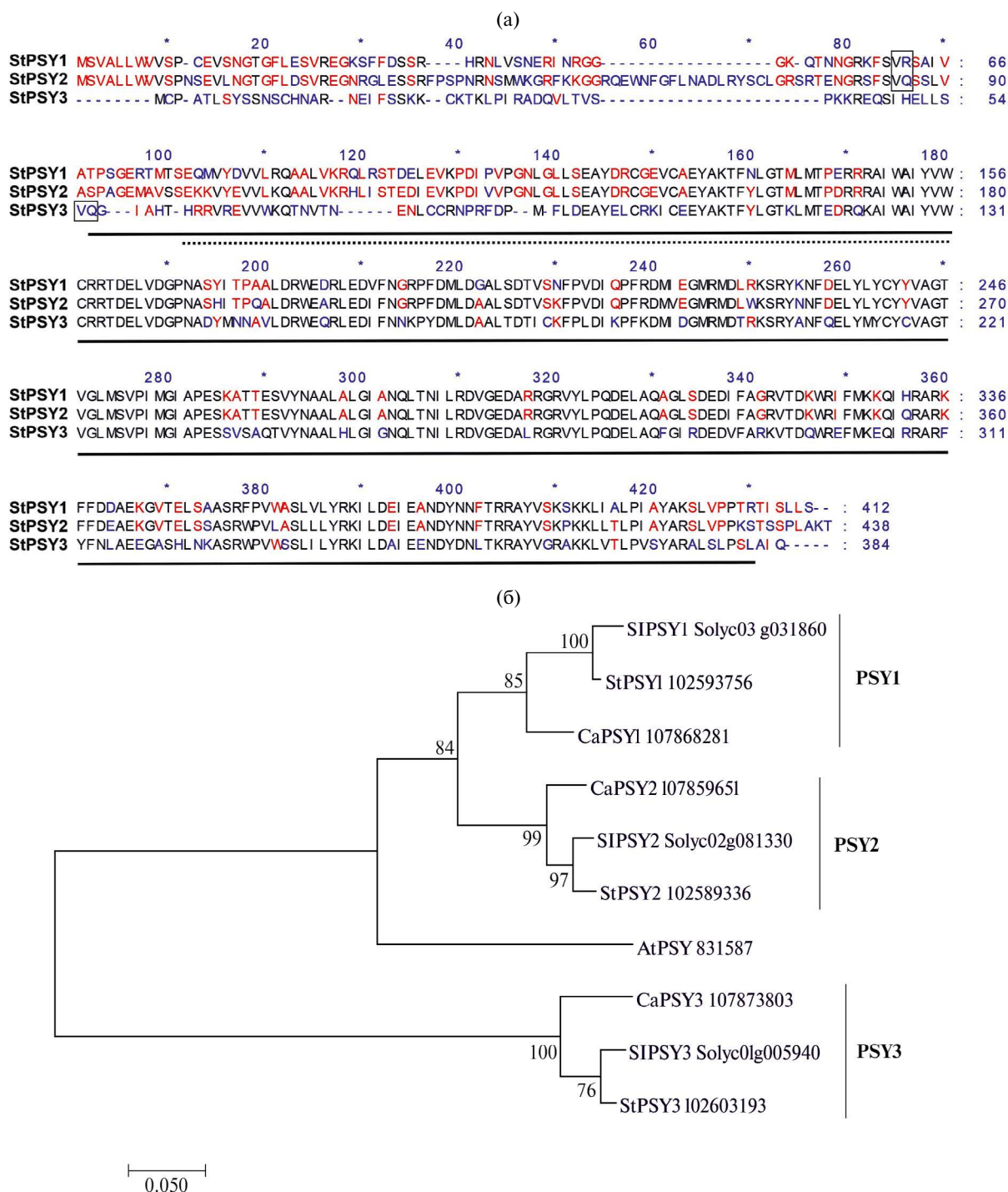


Рис. 1. а – Сравнительное выравнивание аминокислотных последовательностей StPSY1, StPSY2 и StPSY3. Сплошной линией подчеркнут фитоинсинтазный домен PLN02632, прерывистой – начало домена у StPSY3 (NCBI_CDD, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). В рамки взяты предположительные сайты отщепления транзитного пептида. Синим цветом выделены аминокислоты, вариабельные между тремя белками, красным – консервативные у двух белков из трех. **б** – Филогенетическая дендрограмма, построенная при сравнении 13 аминокислотных последовательностей с использованием метода максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, модель JTT, бутстрэп 1000) в программе MEGA7 (<https://www.megasoftware.net/>). Длина ветвей измеряется количеством замен на сайт, в основании ветвей указан процент деревьев, на которых связанные таксоны сгруппированы вместе. Для анализа использованы последовательности гомологов фитоинсинтаз PSY1, PSY2 и PSY3 представителей Пасленовых – *S. tuberosum* (St), *S. lycopersicum* (Sl), *Capsicum annuum* (Ca), а также модельного вида Двудольных – *A. thaliana* (At). Номера доступа в NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) или SolGenomics (<https://www.solgenomics.net/>) приведены рядом с названием анализируемых белков.

Таким образом, предполагая, что *PSY1* и *PSY2* возникли в результате дупликации гена-предшественника, *PSY3*, с вероятным приобретением новых и сохранением старых функций, а также учитывая данные об участии *PSY3* в стрессовых ответах растения, был проведен анализ профиля экспрессии генов *StPSY1*, *StPSY2* и *StPSY3* в ответ на холодостресс. В опыте использовали ранний сорт картофеля Леди Клэр, который пригоден для выращивания в средней полосе России и рекомендуется к высадке в мае, когда в регионе часто случаются возвратные ночные похолодания.

Используя индивидуальные клубни сорта, были получены проростки и доведены до стадии образования 6–7 листьев в условиях экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК ФИЦ Биотехнологии РАН) при длинном фотопериоде и оптимальной для выращивания картофеля температуре (день/ночь 16 ч/8 ч; 23°C). Данные растения были подвергнуты воздействию холодостресса (3°C) в течение ночи (8 ч) для имитации ночного похолодания. Листовой материал собирали в трех временных точках: (точка '0') непосредственно до начала холодостресса и темновой фазы (конец световой фазы); ('6') 6 ч холодостресса и темновой фазы; ('12') 4 ч после возврата в тепло с наступлением световой фазы (рис. 2). В процессе эксперимента опытные растения инкубировались вместе с контрольными в климатической камере с аналогичным световым режимом и температурой 23°C и на время темновой фазы переносились в климатическую камеру, поддерживающую температуру 3°C. Выбор временных точек был основан на данных о суточных колебаниях уровня экспрессии генов *PSY1* и *PSY2*. Ранее показано, что днем значимый уровень экспрессии наблюдается для обоих генов, тогда как ночью фотозависимая экспрессия *PSY2* падает; каротиногенез, необходимый для темновой фазы фотосинтеза, поддерживается активностью *PSY1*, предположительно, от света не зависящей [8].

Опыт проводили в двух биологических и трех технических повторях. Измельченный растительный материал использовали для выделения и очистки суммарной РНК (наборы RNeasy Plant Mini Kit и RNase-free DNase set; QIAGEN, Германия), на основе которой синтезировали кДНК (GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США). Экспрессию генов *StPSY1*, *StPSY2* и *StPSY3* определяли с помощью количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием 3 нг кДНК, набора "Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I и референсного красителя ROX" (ООО "Синтол", Россия), CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США) и программы [5 мин 95°C; 40 циклов (15 с 95°C; 50 с 62°C)].

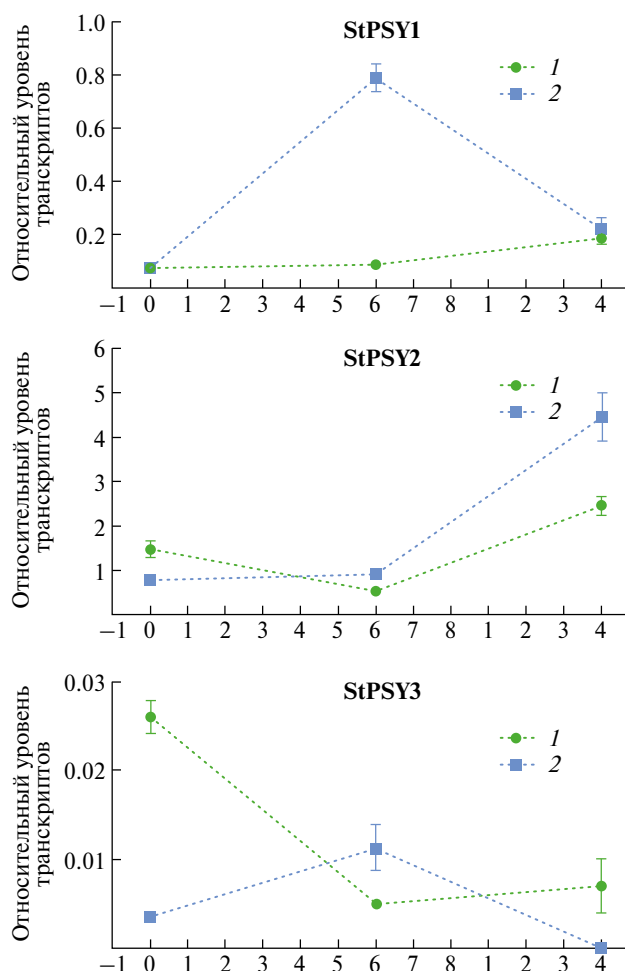
В результате было показано, что в нормальных условиях уровень экспрессии гена *StPSY1* не изменяется при переносе растений в темноту (контроль,

'6' vs. '0') и возрастает через 4 ч после начала световой фазы (контроль, '12' vs. '6'). При воздействии холода (опыт, '6' vs. '0') уровень транскриптов гена *StPSY1* поднимается в ~8 раз, а при возврате в тепло (опыт, '12' vs. '6') опускается в ~3 раза (рис. 2).

В соответствии с предполагаемой главной ролью *PSY2* в каротиногенезе в фотосинтезирующих тканях [8, 9], уровень транскриптов *StPSY2* в проростке картофеля на один и два порядка выше, чем в случае *StPSY1* и *StPSY3* соответственно (рис. 2). При переносе растений в темноту (контроль, '6' vs. '0') экспрессия *StPSY2* и *StPSY3* снижается в ~2.5 и 4 раза соответственно и через 4 ч после начала дня (контроль, '12' vs. '6') вырастает в ~3 раза (*StPSY2*) или не меняется (*StPSY3*). При воздействии холода (опыт, '6' vs. '0') уровень транскриптов не меняется (*StPSY2*) или растет в ~2 раза (*StPSY3*), а при возврате в тепло (опыт, '12' vs. '6') поднимается в ~5 раз (*StPSY2*) или падает почти до нуля (*StPSY3*) (рис. 2).

Поддержание экспрессии *StPSY1* на дневном уровне в темноте (контроль, '0' vs. '6') (рис. 2) говорит о возможном участии гена в темновой фазе фотосинтеза в растениях и о наличии путей фотонезависимой регуляции активности гена. Одновременное падение уровня мРНК генов *StPSY2* и *StPSY3* (контроль, '0' vs. '6') (рис. 2) свидетельствует о регуляции их экспрессии фотозависимым образом. Учитывая разницу в уровне транскриптов в точке '6' для двух температур (опыт 3°C vs. контроль 23°C) (рис. 2), можно утверждать, что экспрессия всех трех генов *StPSY* в разной степени (*StPSY1* — значительно большей, чем *StPSY2* и *StPSY3*) стимулируется воздействием холода.

Для понимания особенностей регуляции экспрессии генов *StPSY1*, *StPSY2* и *StPSY3* был проведен поиск *cis*-регуляторных элементов, ассоциированных с ответом на свет, холод и АБК, в промоторе (1.5 кб) и 5'-UTR генов. В результате было обнаружено 30 (*StPSY1*), 40 (*StPSY2*) и 5 (*StPSY3*) элементов, подавляющее большинство которых (соответственно 24, 29 и 5) представлено чувствительными к свету мотивами (табл. 1), что согласуется с реакцией генов на наличие освещения (рис. 2). АБК-ассоциированных элементов было найдено 5, 11 и 0 соответственно. И только регуляторная область *StPSY1* содержала один мотив (LTR), связанный с ответом на низкие температуры (табл. 1), что согласуется с его повышенной (в сравнении с *StPSY2* и *StPSY3*) реакцией на холодостресс (рис. 2). Помимо вышеуказанных элементов, регуляторные области всех трех генов содержали сайты (*StPSY1* — 54, *StPSY2* — 33, *StPSY3* — 17), ассоциированные со стрессовым ответом, чувствительностью к другим фитогормонам, кроме АБК, и связыванием с транскрипционными факторами. Данные элементы также могут влиять на регуляцию генов *StPSY* в ответ на холодостресс, но не столь очевидно.



		<i>StPSY1</i>	<i>StPSY2</i>	<i>StPSY3</i>
1 vs. 1	1/'0' vs. 1/'6'	0.9997	0.0005	<0.0001
	1/'0' vs. 1/'12'	0.0004	0.0002	<0.0001
	1/'6' vs. 1/'12'	0.0014	<0.0001	0.8541
2 vs. 2	2/'0' vs. 2/'6'	<0.0001	0.9979	0.0014
	2/'0' vs. 2/'12'	<0.0001	<0.0001	0.5098
	2/'6' vs. 2/'12'	<0.0001	<0.0001	0.0008
3 vs. 3	1/'0' vs. 2/'0'	>0.9999	0.0073	<0.0001
	1/'0' vs. 2/'6'	<0.0001	0.0397	<0.0001
	1/'0' vs. 2/'12'	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	2/'0' vs. 1/'6'	0.9972	0.9574	0.9658
	2/'0' vs. 1/'12'	0.0002	<0.0001	0.2325
	1/'6' vs. 2/'6'	<0.0001	0.5912	0.0136
	1/'6' vs. 2/'12'	<0.0001	<0.0001	0.2042
	2/'6' vs. 1/'12'	<0.0001	<0.0001	0.1378
	1/'12' vs. 2/'12'	0.7166	<0.0001	0.0316

Рис. 2. Уровень экспрессии генов *StPSY1* (NCBI Gene ID 102593756), *StPSY2* (102589336) и *StPSY3* (102603193) в листовой ткани контрольных (1) и опытных (2) проростков [0 ч 23°C ('0'); 6 ч темновой фазы, 23°C/3°C ('6'); 4 ч световой фазы 23°C ('12')] образцов картофеля сорта Леди Клэр. Дневной и ночной периоды обозначены под графиками белым и серым боксами соответственно. Праймеры: *PSY1* (5'-catgctcgatggtgctttgtc-3' и 5'-gacttctcaagtc-catacga-3'); *PSY2* (5'-aactgagctctgctagatg-3' и 5'-gcactagatcttgcatagca-3'); *PSY3* (5'-gcctagttagccattcaatagac-3' и 5'-gcctagagtgtgatcgaacgattc-3'). Данные нормализованы по двум референсным генам: *ef11* (LOC102600998; 5'-attggaacggatagctcca-3' и 5'-tccttactgaacgcctgtca-3') и *SEC3A* (LOC102599118; 5'-gcttgacacgccatcatcaat-3' и 5'-tggattttaccaccttcgca-3'). Статистическая обработка (one-way ANOVA; "multiple comparisons, corrected with Bonferroni test") проведена с помощью GraphPad Prism v. 8 (GraphPad Software Inc., США) на основе двух биологических и трех технических повторов ($p < 0.05$ для значимых различий); в таблице (справа) красным выделены p -value для незначимых различий.

В целом, результаты структурно-функционального анализа генов фитоинсинтаз картофеля предполагают участие *StPSY1*, *StPSY2* и *StPSY3* в ответе растения на холод. Наибольшая среди генов реакция *StPSY1* может быть связана с наличием *цис*-регуляторных элементов, ассоциированных с чувствительностью к холоду и АБК (апокаротиноид). Участие в ответе на холод *StPSY2* и *StPSY3* менее заметно и может зависеть от количества АБК (*StPSY2*) и/или других фитогормонов (*StPSY2* и *StPSY3*). В то же время экспрессия всех трех генов находится под регуляторным воздействием освещения, что для *StPSY3* показано впервые.

Таким образом, *PSY1* и *PSY2* могли унаследовать от эволюционно более древнего гена *PSY3* роль в синтезе каротиноидов, светочувствительность и базовую способность реагировать на стрессовые факторы. Усложнение функций генов *PSY1* и *PSY2*, вероятно, связано с существенными эволюционными модификациями, как в регуляторной области (приобретение 5'-UTR, обогащение промотора регуляторными элементами), так и в кодирующей последовательности (транзитный пептид, каталитический домен). Как результат можно отметить существенно более высокие в сравнении с *PSY3* уровни экспрессии обоих генов

Таблица 1. Свет-, холод- и АБК-чувствительные *цис*-регуляторные элементы, обнаруженные в области промотора и 5'-UTR генов *StPSY1*, *StPSY2* и *StPSY3*

Ген	Количество <i>цис</i> -регуляторных элементов, промотор/5'-UTR														
	Светочувствительные элементы														АБК
	TCCC-motif	Box 4	ATC-motif	GATA-motif	TCT-motif	ACE	AE-box	MRE	Box II	G-box	GT1-motif	chs-CMA1a	Gap-box	LAMP-element	wABRE
<i>StPSY1</i>	0/0	4/0	0/0	1/0	0/1	1/0	0/1	4/1	1/0	2/4	3/1	0/0	0/0	0/0	2/3
<i>StPSY2</i>	0/1	2/1	0/0	1/1	2/0	0/0	0/1	1/0	1/1	6/3	2/2	1/0	0/1	1/1	7/4
<i>StPSY3</i>	1/—	1/—	2/—	1/—	0/—	0/—	0/—	0/—	0/—	0/—	0/—	0/—	0/—	0/—	0/—

Поиск осуществлялся в программе PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)

в тканях растений, а также усиленную реакцию *StPSY1* на холодовой стресс.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке ФНТП развития сельского хозяйства РФ на 2017—2025 гг. (под-программа “Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации”).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ И СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Stra A., Almarwaey L. O., Alagoz Y., et al.* Carotenoid Metabolism: New Insights and Synthetic Approaches // *Front. Plant Sci.* 2023. V. 13. P. 1072061.

2. *Shumskaya M., Bradbury L. M. T., Monaco R. R., et al.* Plastid Localization of the Key Carotenoid Enzyme Phytoene Synthase is Altered by Isozyme, Allelic Variation, and Activity[W] // *Plant Cell.* 2012. V. 24(9). P. 3725–3741.

3. *Stauder R., Welsch R., Camagna M., et al.* Strigolactone Levels in Dicot Roots are Determined by an Ancestral Symbiosis-regulated Clade of the PHYTOENE SYNTHASE Gene Family // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 255.

4. *Bartley G.E., Viitanen P.V., Bacot K.O., et al.* A Tomato Gene Expressed During Fruit Ripening Encodes an Enzyme of the Carotenoid Biosynthesis Pathway // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267(8). P. 5036–5039.

5. *Bartley G.E., Scolnik P.A.* cDNA Cloning, Expression During Development, and Genome Mapping of PSY2, a Second

Tomato Gene Encoding Phytoene Synthase // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268(34). P. 25718–25721.

6. *Li F.Q., Vallabhaneni R., Wurtzel E.T.* PSY3, a New Member of the Phytoene Synthase Gene Family Conserved in the Poaceae and Regulator of Abiotic Stress-induced Root Carotenogenesis // *Plant Physiol.* 2008. V. 146(3). P. 1333–1345.

7. *Welsch R., Wust F., Bar C., et al.* A Third Phytoene Synthase is Devoted to Abiotic Stress-induced Absciscic Acid Formation in Rice and Defines Functional Diversification of Phytoene Synthase Genes // *Plant Physiol.* 2008. V. 147(1). P. 367–380.

8. *Li F., Vallabhaneni R., Yu J., Rocheford T., et al.* The Maize Phytoene Synthase Gene Family: Overlapping Roles for Carotenogenesis in Endosperm, Photomorphogenesis, and Thermal Stress Tolerance // *Plant Physiol.* 2008. V. 147(3). P. 1334–1346.

9. *Fantini E., Falcone G., Frusciante S., et al.* Dissection of Tomato Lycopene Biosynthesis through Virus-induced Gene Silencing // *Plant Physiol.* 2013. V. 163(2). P. 986–998.

10. *Lisboa M.P., Canal D., Filgueiras J.P.C., et al.* Molecular Evolution and Diversification of Phytoene Synthase (PSY) Gene Family // *Genetics and Molecular Biology.* 2022. V. 45(4). P. e20210411.

11. *Valcarcel J., Reilly K., Gaffney M., et al.* Levels of Potential Bioactive Compounds Including Carotenoids, Vitamin C and Phenolic Compounds, and Expression of Their Cognate Biosynthetic Genes Vary Significantly in Different Varieties of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Grown Under Uniform Cultural Conditions // *J. Sci. Food Agric.* 2016. V. 96(3). P. 1018–1026.

12. *Кулакова А.В., Шенникова А.В., Кочиева Е.З.* Экспрессия генов биогенеза каротиноидов в процессе длительного холодового хранения клубней картофеля // *Генетика.* 2023. T. 59(8). С. 914–928.

13. *Giorio G., Stigliani A.L., D'Ambrosio C.* Phytoene Synthase Genes in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.): New Data on the Structures, the Deduced Amino Acid Sequences and the Expression Patterns // *FEBS Letters.* 2008. V. 275. P. 527–535.

14. *Ryzek N., Łys A., Makołowska I.* The Functional Meaning of 5'UTR in Protein-coding Genes // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24(3). P. 2976.

***SOLANUM TUBEROSUM* L. PHYTOENE SYNTHASE GENES
(*StPSY1*, *StPSY2*, *StPSY3*) PARTICIPATE IN THE POTATO PLANT'S
RESPONSE TO COLD STRESS**

A. V. Kulakova^{a, #}, A. V. Shchennikova^a, and E. Z. Kochieva^a

^a*Institute of Bioengineering, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology"
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: kulakova_97@mail.ru*

Presented by Academician of the RAS V.O. Popov

The structure and phylogeny of the genes *StPSY1*, *StPSY2* and *StPSY3*, encoding phytoene synthases from *Solanum tuberosum* L., were characterized. The expression of these genes in potato seedlings was studied in response to exposure to cold stress in the dark phase of the diurnal cycle as an imitation of night cooling. It was found that all three genes are activated when the temperature decreases, and the greatest response is observed for *StPSY1*. The response of the *StPSY3* gene to cold stress and photoperiod has been demonstrated for the first time. A search was carried out for *cis*-regulatory elements in the promoter region and 5'-UTR of the *StPSY* genes and it was shown that the regulation of all three genes is associated with the response to light. The high level of low-temperature activation of the *StPSY1* gene may be associated with the presence of *cis*-elements associated with sensitivity to cold and ABA.

Keywords: potato, *Solanum tuberosum*, carotenoid biosynthesis, phytoene synthase PSY, cold stress

УДК 57

ВЛИЯНИЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА В ПОЛОСТЬ НОСА КРЫС НА УСЛОВНЫЙ РЕФЛЕКС ПАССИВНОГО ИЗБЕГАНИЯ И УРОВЕНЬ МОНОАМИНОВ В ГИПОТАЛАМУСЕ

© 2024 г. А. Г. Королев^{1,2,*}, И. В. Кастыро², А. Н. Иноземцев¹, А. В. Латанов¹

Представлено академиком РАН И.В. Решетовым

Поступило 15.01.2024 г.

После доработки 07.02.2024 г.

Принято к публикации 08.02.2024 г.

В биологической модели септопластики на крысах исследовано влияние операции на выработку условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ). Показано, что септопластика усиливает тревожность и уменьшает исследовательскую активность грызунов в условиях УРПИ. Нейрохимический анализ гипоталамуса, проведенный сразу после окончания эксперимента, выявил повышение метаболизма норадреналина у крыс после септопластики, что может быть связано с активацией гипоталамо-гипофизарной-надпочечниковой оси.

Ключевые слова: крысы, септопластика, пассивное избегание, память, стресс, норадреналин

DOI: 10.31857/S2686738924030028, **EDN:** VUVPIO

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее распространенных хирургических вмешательств в отоларингологии является септопластика — операция на носовой перегородке. Особенностью области, в которой проводится данная процедура, является ее анатомическая близость к головному мозгу и обширная иннервация черепно-мозговыми нервами. Эта особенность обусловила большой интерес исследователей. Большинство работ касается регенерации тканей в месте повреждения и поиска оптимального метода их иссечения. Исследования на людях и животных показали, что в результате операции формируются продолжительные морфологические изменения в области оперативного вмешательства [1], болевой синдром, гипоксия и гиперкапния [2]. Было показано также, что в течение недели после операции у крыс выявляются увеличение экспрессии белков апоптоза и морфологические изменения нейронов в различных отделах

гиппокампа [3]. Кроме того, после операции развивались неспецифические адаптационные реакции на хирургический стресс в виде чрезмерной активации симпатических реакций организма [4].

Влияние септопластики на обучение и память до настоящего времени не изучалось. Целью нашей работы стал анализ влияния септопластики на выработку условного рефлекса пассивного избегания в трехкамерной установке, позволяющей исследовать процесс формирования памяти, включая ее пространственный компонент. Дополнительно исследовались изменения в метаболизме норадреналина в гипоталамусе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 16 самцах крыс Вистар (питомник — Филиал “Столбовая” ФГБУН “Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства” России) массой 320–360 г, в возрасте 3.5 месяца. Животных содержали по 4 крысы в клетке в условиях 12-часового светового дня при свободном доступе к воде и корму. Эксперименты выполнены в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU.

Крысы контрольной группы (n = 8) подвергались общей анестезии посредством внутрибрюшинной инъекции комбинированного препарата “Золетил 100” (телетамин + золазепам в дозировке 30 мг/кг).

¹Кафедра высшей нервной деятельности, Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Медицинский институт ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва, Россия

*e-mail: korolevpost@gmail.com

Экспериментальным крысам ($n = 8$) под общей анестезией проводили септопластику.

Суть методики состоит в формировании морфологических изменений слизистой оболочки и подслизистого слоя перегородки носа, а также местных реакций иммунной системы, аналогичных тем, что возникают после операции септопластики на человеке.

Для унилатерального повреждения носовой перегородки крысе в ноздрю на глубину 20–25 мм вводили металлический зонд длиной 100 мм. После введения зонда зигзагообразными движениями проводилась скарификация слизисто-надхрящечного слоя носовой перегородки. Для предупреждения асфиксии кровь аспирировали электроаспиратором.

На 4-й послеоперационный день начинали выработку УРПИ [5]. Опыт проводили в установке ($90 \times 30 \times 30$ см), состоящей из центрального освещенного отсека (90 лк) с гладким полом и двух боковых темных отсеков с решетчатым электрифицированным полом из стальных прутьев. Отсеки были разделены перегородками с дверками. В первый день крысу сажали в центральный освещенный отсек и в течение 5 мин наблюдали за ее поведением. Через 24 ч начинали выработку УРПИ. Для этого крысу снова сажали в центральный отсек, и когда животное переходило в один из боковых темных отсеков, дверка за ней закрывалась, блокируя выход, и крыса получала удар током силой 0.7 мА в течение 5 с. Далее крысу возвращали в домашнюю клетку. Темный отсек, в котором крыса получила удар током, в протоколе отмечали как “опасный”, а противоположный темный отсек — как “безопасный”. На третий день, через 24 ч, тестировали след памяти об ударе током. Для этого крысу, как и в день выработки УРПИ, сажали на обычную стартовую позицию и в течение 5 мин регистрировали активность животного. В ходе опыта регистрировали латентный период перехода в темный отсек (ЛП, в секундах) и выбор отсека, время обследования входов в отсеки (продолжительность обнюхиваний входов и заглядывания в них, с), стойки (n) и замирания (с).

После тестирования УРПИ крыс декапитировали и извлекали головной мозг. На льду из мозга выделяли гипоталамус, помещали его в эппендорф, взвешивали и немедленно замораживали в жидком азоте. Содержание моноаминов и их метаболитов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ ЭД) на хроматографе LC-304T (BAS, США) с аналитической колонкой ReproSil-Pur ODS (C18, 100×4 мм, 3 мкм) (Dr. Maisch, Германия). Скорость элюции подвижной фазы составляла 1.0 мл/мин, давление ~200 атм. Перед экспериментами по определению содержания нейротрансмиттеров пробы размельчали в гомогенизаторе Поттера (тефлон–стекло) в 1 мл 0.1 N HClO₄

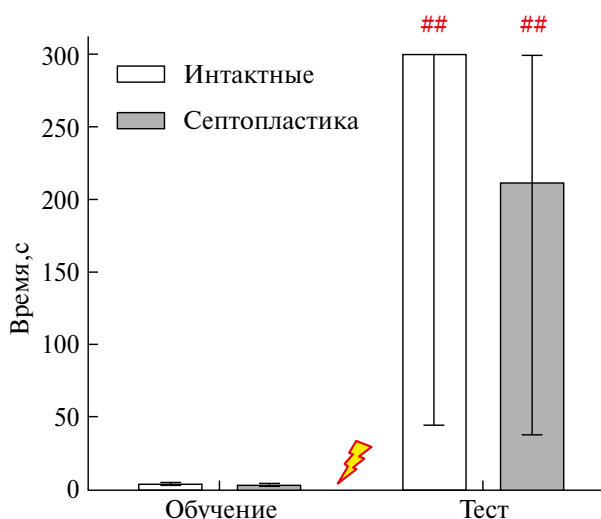


Рис. 1. ЛП ухода в темный отсек до и после выработки УРПИ.

* – различие значимо ($p < 0.05$) по U-критерию Манна–Уитни при сравнении с контрольной группой; # – ($p < 0.05$) и ## ($p < 0.01$) по T-критерию Вилкоксона.

с добавлением 3,4-диоксибензиламина (0.5 нмоль/мл) в качестве внутреннего стандарта. Пробы центрифугировали при 12 000 g в течение 10 мин. Мобильная фаза состояла из: 0.1 М цитратно-фосфатного буфера, содержащего 1.1 mM октансульфоновой кислоты, 0.1 mM ЭДТА и 9%-го ацетонитрила (pH 3.0). Измерение проводили с помощью электрохимического детектора LC-4B (BAS, США) на двойном стеклоугольном электроде (+0.85 V) против электрода сравнения Ag/AgCl. Для регистрации образцов и обработки данных использовали программу “Мультихром” 1.5 (“Амперсенд”, Россия). Расчет концентрации моноаминов проводили методом “внутреннего стандарта”, который анализирует отношения площади пиков хроматограммы для образцов головного мозга и в стандартной смеси (для калибровки использовали смесь рабочих стандартов определяемых веществ в пикомолярных концентрациях) [6].

Оценку значимости межгрупповых различий и внутригрупповых различий проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни и T-критерия Вилкоксона в GraphPad Prism 8.0 (“GraphPad Software”, США). Значимость различий частоты заходов в опасный и безопасный отсеки рассчитывали с помощью критерия согласия частот [7] в STADIA 8.0 (Россия). На графиках данные представлены в виде медиан с межквартильным размахом (Q25–Q75).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Контрольные и опытные крысы, помещенные в центральный отсек до удара током, быстро переходили в один из темных отсеков, что отразилось

Таблица 1. Выбор крысами отсека в день тестирования УРПИ

Группа	Выбранный отсек							
	Опасный		Центральный		Безопасный			
	n	%	n	%	n	%	Z	p
Интактные	3	37.5	5	62.5	0	0	2.562	0.0104*
Септопластика	1	12.5	4	50	3	37.5	1.732	0.08327

* — величины критериев согласия частот и уровней значимости указаны относительно величины выбора “опасного” отсека (Опасный отсек vs, Безопасный отсек, $p < 0.05$).

в одинаково коротких ЛП соответствующей реакции (рис. 1). Удар током крыс контрольной и опытной групп привел к многократному росту ЛП ухода из центрального отсека, в среднем увеличившись в 100 и 60 раз соответственно. Согласно классическим представлениям [8], увеличение ЛП этой реакции свидетельствует о формировании следа памяти об ударе током в темном отсеке, позволяющем избегать захода в него при повторном помещении в установку и оставаться в освещенном отсеке.

Использованная нами модификации теста позволила получить данные о пространственном компоненте УРПИ. Результаты опыта показывают, что крысы заходят в опасный отсек не реже, чем выбирают безопасный отсек или остаются в центральном отсеке (табл. 1). Более того, контрольные крысы парадоксальным образом статистически значимо чаще заходят в опасный отсек, если не остаются в центральном

отсеке. Эти результаты согласуются с полученными ранее [5]. Из результатов следует заключить, что след памяти отражает только электроболевое воздействие как таковое безотносительно к месту его нанесения. Таким образом, септопластика не повлияла на оба использованных показателя памяти. Это произошло, по нашему мнению, по следующим причинам. Септопластика не уменьшила выбор безопасного отсека из-за того, что этот показатель исходно находился на минимальном уровне; для выявления влияния на ЛП, как показывает экспериментальная практика, требуются большие выборки.

Дополнительная информация об эффектах септопластики была получена из анализа 5-минутных наблюдений за поведением крыс. Было установлено, что до удара током время обследования входов и число стоек у опытных и контрольных крыс значимо не отличались (рис. 2, а–б).

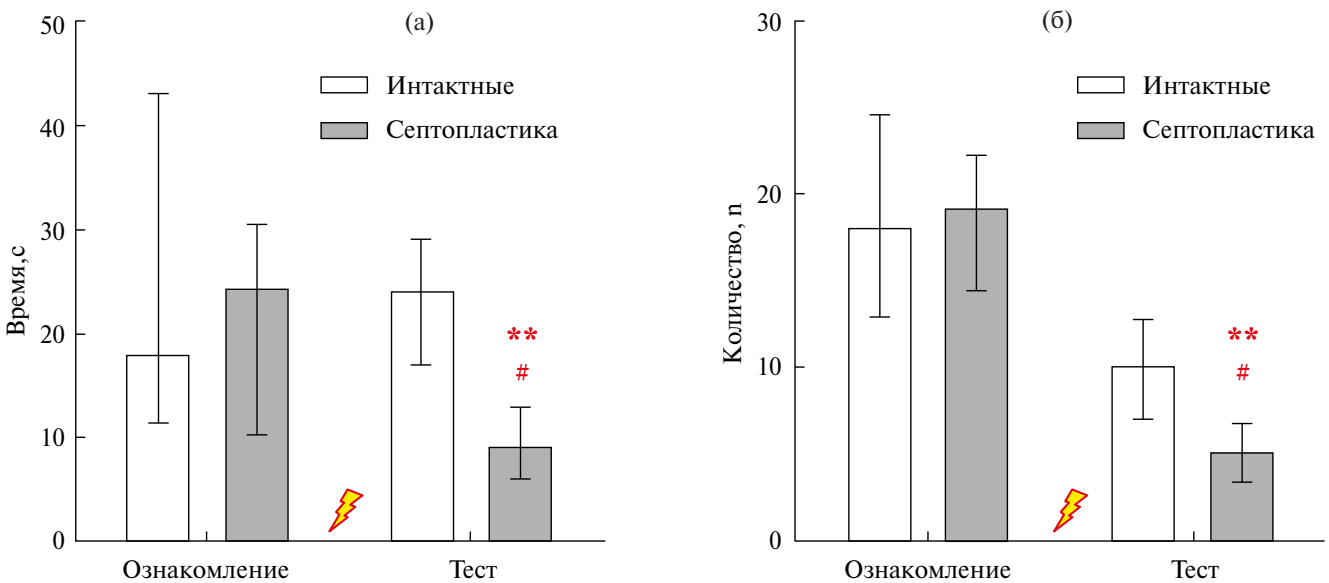


Рис. 2. Влияние септопластики на а — время обследования входов и б — количество стоек до и после выработки УРПИ.

** — различие значимо ($p < 0.01$) по U-критерию Манна–Уитни при сравнении с контрольной группой; # — различие значимо ($p < 0.05$) по T-критерию Вилкоксона при сравнении показателей до и после удара током.

Таблица 2. Содержание моноаминов и их метаболитов (нмоль/г ткани) в гипоталамусе крыс

Группа	НА	МОФЕГ	МОФЕГ/НА
Интактные	9.5 ± 3.2	0.06 ± 0.04	0.006 ± 0.004
Септопластика	9.05 ± 3.4	0.10 ± 0.04*	0.011 ± 0.006*

*— различие значимо ($p < 0.05$) по U-критерию Манна-Уитни при сравнении с контрольной группой.

При тестировании УРПИ у опытных крыс, как это следует из рис. 2, обнаружены уменьшение времени обследования входов в темные отсеки и числа стоек относительно как исходных, так и контрольных значений. Это свидетельствует об уменьшении исследовательской активности у крыс под влиянием септопластики. Кроме того, выявлены значимые различия ($p = 0.004$) во времени реакции замирания: у крыс опытной группы оно составило 19.1 (12.1–41.9) с, а контрольной 2.8 (0–8.2) с, что свидетельствует о повышенном уровне тревожности у опытных животных в условиях УРПИ.

Из литературы известно, что тревожность связана с повышением уровня глюкокортикоидов в крови [9]. Спустя несколько дней после септопластики наблюдается повышение уровня кортизола у человека [10] и кортикостерона у крыс [11], что свидетельствует о продолжительной активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси. Операция влияет на вариабельность сердечного ритма у крыс в результате усиления симпатического тонуса ЦНС [11]. На фоне физиологического стресса, предварительно вызванного социальной изоляцией [12], происходит изменение выработки УРПИ в виде уменьшения ЛПУхода в темный отсек.

Так как нейрогуморальные механизмы тревожности и стресса во многом зависят от активности гипоталамуса, мы исследовали изменения концентрации и метаболизма норадреналина в данной структуре. Обнаружено, что у опытных животных наблюдалось значимое увеличение относительно контроля метаболита норадреналина 3-метокси-4-гидроксифенилгликоля (МОФЕГ) и соотношение МОФЕГ/НА (табл. 2).

Из литературных данных известно, что воздействие различных стрессирующих факторов, в том числе тока при выработке рефлексов, приводит к усилению активности норадренергической системы и метаболизма данного нейромедиатора в гипоталамусе и миндалине [13]. Перечисленные изменения связаны с повышенной тревожностью и психоэмоциональным стрессом, а также выработкой и воспроизведением следа памяти [14]. Зафиксированный нами рост метаболизма НА согласуется с перечисленными фактами и высокой тревожностью крыс, перенесших септопластику.

Таким образом, на биологической модели септопластики было показано усиление тревожности,

сопровождающееся ростом метаболизма норадреналина у крыс, перенесших операцию, в условиях УРПИ. Полученные результаты согласуются с имеющимися представлениями о механизмах развития физиологического стресса, в частности, активации гипоталамо-гипофизарной-надпочечниковой оси. Модель эффективно воспроизводит поведенческие и нейрохимические изменения после хирургического вмешательства в носовую полость. Полученные в ходе исследования результаты расширяют представления о возможных послеоперационных изменениях высших психических функций и когнитивной деятельности человека, вызванных хирургическим вмешательством в челюстно-лицевой области и затрагивающих периферический отдел обонятельного анализатора. Данные эксперимента могут быть использованы в доклинических исследованиях для оценки эффективности и поиска новых медикаментозных препаратов, используемых в восстановительном периоде после септопластики.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке задания “Нейробиологические основы поведения животных” (номер гостемы 11-1-21, номер ЦИТИС 121032500080-8).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования одобрены этическим комитетом Медицинского института Российского университета дружбы народов им. Патриса Лумумбы от 18.09.2020 (протокол № 1).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ozdemir S., Celik H., Cengiz C., et al. Histopathological Effects of Septoplasty Techniques on Nasal Septum Mucosa: an Experimental Study // Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 2019. V. 276. № 2. P. 421–427.
2. Koumpa F.S., Ferguson M., Saleh H.A. Delayed-Onset Neuropathic Pain after Septoplasty // Case Rep. Otolaryngol. 2021. № 7. P. 9966318.
3. Кастыро И.В., Хамидулин Г.В., Дьяченко Ю.Е. и др. Исследование экспрессии белка p53 и образования темных нейронов в гиппокампе у крыс при моделировании

- септопластики // Российская ринология. 2023. Т. 31. № 1. С. 27–36.
4. Королёв А.Г., Шмаевский П.Е., Мнацаканян А.Г. и др. Изменения в частотном диапазоне вариабельности сердечного ритма у крыс при моделировании депривации обонятельного анализатора в периферическом и центральном отделах // Head and neck. Голова и шея. Российский журнал. 2023. Т. 11. № 2. С. 38–43.
 5. Inozemtsev A.N., Berezhnoy D.S., Novoseletskaya A.V. Effects of Diazepam, Piracetam, and Mexidol on Passive Avoidance Response // Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2019. V. 74. № 4. P. 215–220.
 6. Кудрин В.С., Наркевич В.Б., Алымов А.А. и др. Динамика формирования нарушений моноаминергических систем мозга потомства мышей линии BALB/c при введении вальпроата натрия беременным самкам: нейрохимическое изучение // Нейрохимия. 2021. Т. 38. № 1. С. 52–58.
 7. Кулаичев А.П. Методы и средства комплексного статистического анализа данных: учеб. пособие. М.: Высшее образование: Бакалавриат, 2017. 484 с.
 8. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж. П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Высшая школа, 1991. 119 с.
 9. Dzijurkowska E., Wesolowski M. Cortisol as a Biomarker of Mental Disorder Severity // J. Clin. Med. 2021. V. 10. № 21. P. 5204.
 10. Chung D.H., Lee K.H., Kim S.W., et al. Comparison of Pre- and Post-operative Stress Levels in Patients with Allergic Rhinitis and Non-allergic Rhinitis // Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 2012. V. 269. № 11. P. 2355–2359.
 11. Kastyro I.V., Popadyuk V.I., Reshetov I.V., et al. Changes in the Time-domain of Heart Rate Variability and corticosterone after Surgical Trauma to the Nasal Septum in Rats // Dokl. Biochem. Biophys. 2021. V. 499. № 1. P. 247–250.
 12. Krupina N.A., Shirenova S.D., Khlebnikova N.N. Prolonged Social Isolation, Started Early in Life, Impairs Cognitive Abilities in Rats Depending on Sex // Brain Sci. 2020. V. 10. № 11. P. 799.
 13. Tsuda A., Ida Y., Satoh H., et al. Stressor Predictability and Rat Brain Noradrenaline Metabolism // Pharmacol. Biochem. Behav. 1989. V. 32. № 2. P. 569–572.
 14. Song Q., Tan Y. Knowledge Mapping of the Relationship between Norepinephrine and Memory: A Bibliometric Analysis // Front. Endocrinol. (Lausanne). 2023. V. 14. P. 1242643.

THE EFFECT OF SURGICAL PROCEDURE IN THE NASAL CAVITY IN RATS ON THE PASSIVE AVOIDANCE CONDITIONING AND THE LEVEL OF MONOAMINES IN THE HYPOTHALAMUS

A. G. Korolev^{a,b,#}, I. V. Kastyro^b, A. N. Inozemtsev^a, and A. V. Latanov^a

^aM.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^bPeoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation

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

Presented by Academician of the RAS I.V. Reshetov

In a biological model of septoplasty in rats, the effect of the operation on the passive avoidance conditioning (PAC) was studied. It has been shown that septoplasty increases anxiety and reduces exploratory activity in rodents under PAC. Neurochemical analysis of the hypothalamus carried out immediately after the end of the experiment revealed an increase in norepinephrine metabolism in rats after septoplasty, which may be associated with activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.

Keywords: rats, septoplasty, passive avoidance, memory, stress, norepinephrine

УДК 551.89:568.26:598.271

КУБИНСКИЙ АРА (*ARA TRICOLOR*) В ВЕРХНЕМ ПЛЕЙСТОЦЕНЕ ЗАПАДНОЙ КУБЫ

© 2024 г. Н. В. Зеленков^{1,*}

Представлено академиком РАН А.В. Лопатиным

Поступило 25.01.2024 г.

После доработки 01.02.2024 г.

Принято к публикации 05.02.2024 г.

Кубинский ара (*Ara tricolor*, Bechstein, 1811) — вымерший вид крупных попугаев со слабо известными историческим распространением и образом жизни. До настоящего времени было описано три верхне-четвертичные палеонтологические и одна археозоологическая (XVII–XVIII вв.) находка вида из центральной части Кубы. В этой статье описана новая (четвертая) ископаемая находка кубинского ары — фрагментарный карпометакарпус из верхнеплейстоценовых слоев пещеры Эль-Аброн в провинции Пинар-дель-Рио. Это первое документированное свидетельство обитания вида в западной части острова Куба. Состав сопутствующей фауны указывает на то, что кубинский ара обитал в условиях мозаичных полуоткрытых болотистых ландшафтов, вероятно сходных с таковыми в окрестностях Сьенага-де-Сапата в современности.

Ключевые слова: птицы, вымершие виды, Psittacidae, Вест-Индия, пещерные отложения, плейстоцен

DOI: 10.31857/S2686738924030033, **EDN:** VUOWFA

Попугаи ара (Aves: Psittacidae, Psittaciformes) отсутствуют в современной фауне Вест-Индии, однако известны из региона по историческим свидетельствам и редким костным остаткам [1–4]. Точное число видов, населявших Вест-Индию в доколумбову эпоху, остается неизвестным — иногда предполагается, что их могло быть до 15 [3]; для многих из них предложены научные названия [4]. В то же время с учетом развитой торговли крупными попугаями и их транспортировки между островами (а также — на острова с континента) как аборигенным населением, так и европейскими колонистами, число вымерших видов в действительности может быть значительно меньшим [1, 4].

Ключевое значение для реконструкции исторического разнообразия ар Вест-Индии играют костные остатки этих попугаев из палеонтологических местонахождений и археологических памятников, к настоящему времени известные для трех вымерших видов: кубинского ары *Ara tricolor* (Bechstein, 1811), *A. autochthones* (Wetmore, 1937) с островов Санта-Крус и Пуэрто-Рико, а также *A. guadeloupensis* (Clark, 1905) из Гваделупы [1, 2, 4–6]. Естественный ареал обитания *A. autochthones* остается неясным, поскольку извест-

ные находки происходят из археологических памятников и, скорее всего, принадлежат ручным птицам [2]. *Ara tricolor* и *A. guadeloupensis*, напротив, известны из плейстоцена [1, 4–6], что позволяет считать их автохтонными обитателями Антильских островов.

Вымерший во второй половине XIX в. кубинский ара изучен значительно лучше остальных видов антильских ар, но даже для него историческое распространение известно очень фрагментарно [4]. Все 19 тушек и чучел *Ara tricolor*, хранящиеся в мировых музеях, не имеют географической привязки [4]. Надежные свидетельства о встречах или добыче этих птиц датируются 1850–1860-ми гг. и приурочены к трем регионам: болоту Сьенага-де-Сапата и его окрестностям в провинции Матансас в центральной Кубе (рис. 1), области между городами Камагуэй и Лас-Тунас в восточной части Кубы, а также, возможно, острову Хувентуд [4]. Более раннее распространение кубинского ары (в том числе — в доисторическое время) остается практически неизвестным. Предполагалось, что вид никогда не был широко распространен на Кубе [7]. Ископаемые остатки *A. tricolor* известны всего из трех четвертичных (предположительно, плейстоцен — середина голоцена) местонахождений: двух в центральной части Кубы на незначительном удалении от Сьенага-де-Сапата (западная часть провинций Вилья-Клара и Сьенфуэгос), а также одного в провинции Гавана [4]. Также имеется

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

*e-mail: nzelen@paleo.ru



Рис. 1. Карта месторасположения пещеры Эль-Аброн на Кубе. Обозначения: 1 — Съенага-де-Сапата.

археозоологическая находка в старом городе Гаваны, датируемая XVII–XVIII вв., и историческое указание на существование охоты на этих птиц в окрестностях Гаваны в XVII в. [1, 8]. Надежных свидетельств обитания вида в западной части острова нет. Единственное упоминание в литературе приведено Т. Барбуром [7]: по словам неназванного источника, кубинский ара не встречался на самом западе острова (Гуане в провинции Пинар-дель-Рио) после сокрушительного смерча 1844 г. (т.е., видимо, он обитал там до этого времени) [7].

В ноябре–декабре 2019 г. в рамках Совместной российско-кубинской палеонтологической экспедиции были организованы раскопки в пещере Эль-Аброн (провинция Пинар-дель-Рио, западная Куба; рис. 1) — богатом местонахождении позднечетвертичной фауны, откуда известно значительное таксономическое разнообразие позвоночных, включая птиц [9–18]. Ранее для местонахождения указывались остатки двух современных видов попугаев — *Amazona leucosephala* (Linnaeus, 1758) и *Aratinga euops* (Wagler, 1832) [11]. В новых материалах имеется фрагментарный карпометакарпус вымершего кубинского ары, описанный в данной работе. Это четвертая ископаемая находка данного вида и единственная, происходящая из стратифицированного местонахождения с датированными остатками плейстоценовой фауны [9]. Материал хранится в Палеонтологическом институте им. А.А. Борисяка РАН (ПИН).

В отложениях пещеры Эль-Аброн выделяют девять слоев [11], из которых нижние (слои IX–IV) формируют непрерывную последовательность с единой по своему составу фауной [11, 13, 16, 18]. Для слоя VII имеется радиоуглеродная датировка в 17406 ± 161 лет (с учетом калибровки: 20050–21474 лет [9]), указывающая на его плейстоценовый возраст. Выше лежащие слои VI–IV ранее также предположительно были отнесены к плейстоцену [13, 16]. Новые представления о климатических условиях, в которых формировались отложения пещеры [18], позволяют подтвердить плейстоценовый возраст всей последовательности слоев IX–IV.

Слой VII, исходя из имеющейся датировки, можно соотносить с последним ледниковым максимумом (26.5–19 тыс. л.н.). В Карибском регионе эта эпоха характеризуется прохладным и умеренно влажным климатом [19, 20], что также реконструируется и для времени накопления отложений слоя VII [18]. Расположенные выше по разрезу слои VI–IV фиксируют возможное изменение климата на более холодный и сухой [18]; в Карибском регионе такая смена условий характеризует переход от максимума ледниковья к позднеледниковью (18–11 тыс. л.н.) — периоду, для которого характерен региональный максимум холода и аридизации за последние 82 тыс. лет [20]. При этом наиболее сухие климатические условия в Карибском регионе, сопровождавшиеся деградацией лесов и их сменой кустарниковыми зарослями на Юкатане [19], характеризуют интервал 17–14.7 тыс. л.н. [20]. В то же время переход к голоцену (начиная с ~12.5 тыс. л.н.) маркируется в регионе контрастным изменением природных обстановок: ростом влажности климата и быстрым развитием тропических лесов [19]. В местонахождении Эль-Аброн голоценовым условиям соответствует авифауна верхних слоев III–I, в которых преобладают типичные лесные обитатели [16]. Слой VI, в верхах которого была найдена описываемая кость кубинского ары, таким образом, можно уверенно относить к финалу плейстоцена.

Фрагментарный левый карпометакарпус (экз. ПИН, № 5781/39) характеризуется тем, что дорсальный край малой метакarpалии располагается на уровне дорсальной поверхности кости и контактирует с дистальным окончанием дорсального края пястного блока (рис. 2, dtc, mim). Такое строение имеется у *Columbidae* и *Psittacidae*; у остальных птиц малая метакarpалия либо сдвинута вентрально, либо ее проксимальное окончание выражено отодвинуто дистально относительно дистального края пястного блока. При этом у *Columbidae* при виде с каудальной стороны пястный блок широкий, его вентральный край ориентирован в значительной степени продольно длинной оси кости, проксимальная часть малой метакarpалии не выпуклая дорсально; при виде с дорсальной стороны проксимальный эпифиз краниокаудально расширен. У *Psittacidae*, напротив, пястный блок узкий, суживается дистально за счет того, что его вентральный край ориентирован косо по отношению к длинной оси кости; проксимальная часть малой метакarpалии явно выпуклая дорсально при виде с каудальной стороны; при виде с дорсальной стороны проксимальный эпифиз краниокаудально узкий. Экз. ПИН, № 5781/39 соответствует *Psittacidae* по всем указанным признакам, а также по строению *fovea carpalis caudalis* (умеренно глубокая, не расширенная) и наличию продолговатого отпечатка на месте *processus intermetacarpalis*.

Экз. ПИН, № 5781/39 значительно крупнее карпометакарпуса кубинского амазона (*Amazona*

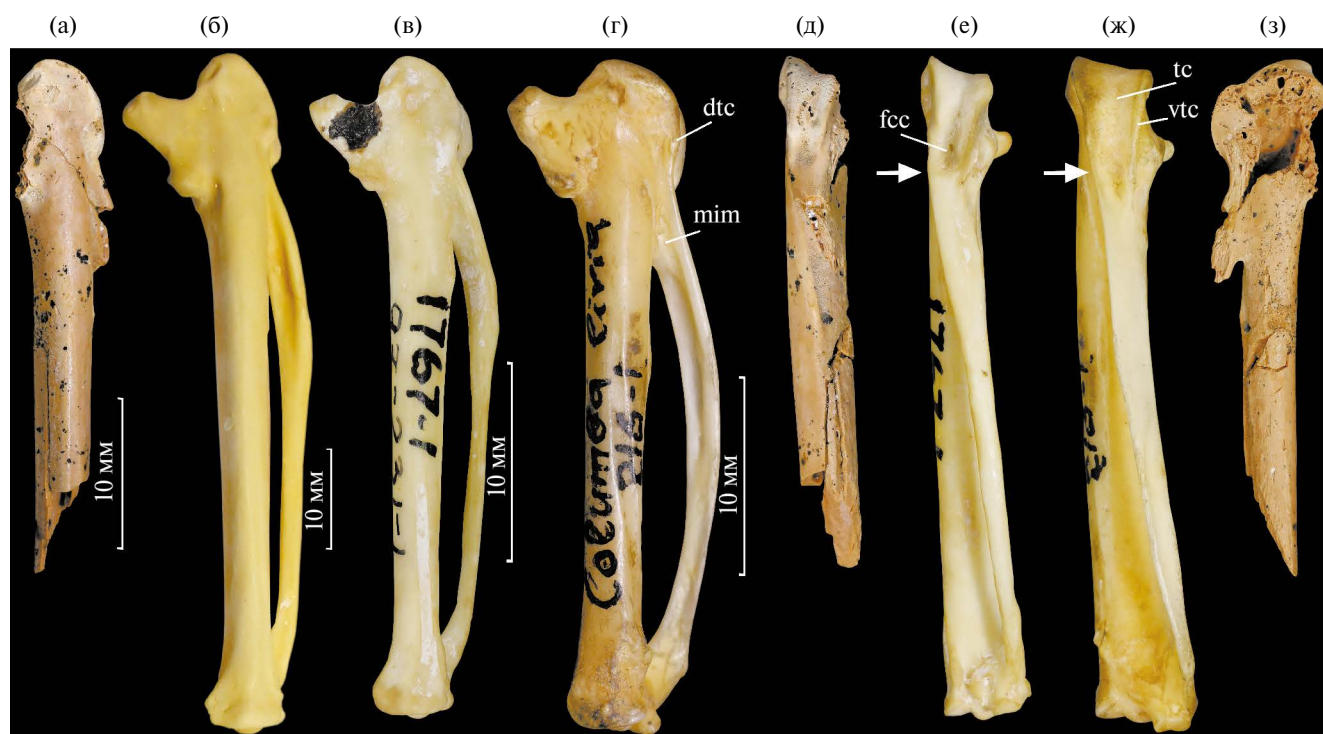


Рис. 2. Карпометакарпус кубинского ары *Ara tricolor* (Bechstein, 1811) в сравнении с избранными современными Psittacidae и Columbidae: (а), (д), (з) — *Ara tricolor*, экз. ПИН, № 5781/39; местонахождение: пещера Эль-Аброн, Куба, провинция Пинар-дель-Рио, верхний плейстоцен; (б) — *Ara militaris* (Linnaeus, 1766), экз. 2006.0311 коллекции Музея естественных наук Барселоны, современный; (в), (е) — *Amazona leucocephala* (Linnaeus, 1756), экз. остеологической коллекции ПИН РАН, № 97-231-1, современный; (г), (ж) — *Columba livia* (Gmelin, 1789), экз. остеологической коллекции ПИН РАН, № 91-1-1, современный; (а)–(г) — с дорсальной стороны; (д)–(ж) — с каудальной стороны; (з) — с вентральной стороны. Обозначения: drc, дорсальный край пястного блока; fcc, fovea carpalis caudalis; mim, малая метакарпalia; tc, пястный блок; vrc, вентральный край пястного блока; стрелкой показана проксимальная часть малой метакарпалии (выпуклая дорсально у Psittacidae; см. текст).

leucocephala) и по размерам соответствует карпометакарпусу *Ara tricolor*. Восстановленная полная длина описываемого экземпляра составляет около 45 мм (42.6–45.2 мм у двух известных экземпляров *Ara tricolor* [2]; 32.3 мм у *Amazona leucocephala*, экз. остеологической коллекции ПИН РАН, № 97-23-1). Других вымерших попугаев с Кубы неизвестно, поэтому находка отнесена к кубинскому ару.

Находка кубинского ары в плейстоценовых слоях пещеры Эль-Аброн впервые подтверждает существование вида в западной части острова в позднем плейстоцене. Ранее было показано [16], что фауна плейстоценовых слоев пещеры Эль-Аброн включает значительное таксономическое и экологическое разнообразие птиц — в том числе, обитателей открытых и околородных ландшафтов (утки, пастушки, кулики и др.), в то время как в голоценовых слоях представлены почти исключительно лесные птицы (в частности, очень многочисленные дятлы). Ископаемая фауна рептилий также подтверждает наличие разнообразных обстановок в окрестностях пещеры в позднем плейстоцене [13]. Кубинский ара, таким образом, по-види-

мому, обитал в позднем плейстоцене западной Кубы в условиях мозаичных открытых или полуоткрытых ландшафтов — возможно, сходных с болотистыми пальмовыми саваннами, в которых жили последние известные представители вида в Съенага-де-Сапата [4]. Можно предположить, что такие местообитания были оптимальными для вида и лучше всего отвечали его предполагаемой пищевой специализации к питанию твердыми семенами пальм [1].

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарен академику А.В. Лопатину (ПИН РАН) за замечания по тексту статьи, а также членам полевых работ на местонахождении: А.К. Агаджаняну, Е.В. Сыромятниковой (ПИН РАН), Р. Рохасу Консуэгра (Центр изучения нефти; Гавана, Куба), Х. Пахону Морехону, Э. Аранде Педросо, Л.А. Барсага Родригесу, С. Фиоль Гонсалес и Э. Перес Лоренцо (Национальный музей естественной истории Кубы, Гавана). Кроме того, автор признателен Е.С. Беличенко (ПИН РАН) за помощь в сортировке материала и Е.В. Сыромятниковой за помощь с подготовкой карты.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Полевые работы выполнялись при финансовой поддержке РФФИ и СИТМА (научный проект № 18-54-34004 “Позднечетвертичные позвоночные Кубы: реликтовые фауны на пороге голоценового вымирания”).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Olson S.L., Suarez W. A Fossil Cranium of the Cuban Macaw *Ara tricolor* (Aves: Psittacidae) from Villa Clara Province, Cuba // Caribbean Journal of Science. 2008. V. 44. P. 287–290.
2. Olson S.L., Maíz López E. New Evidence of *Ara Autochthonos* from an Archaeological Site in Puerto Rico: A Valid Species of West Indian Macaw of Unknown Geographical Origin (Aves: Psittacidae) // Caribbean Journal of Science. 2008. V. 44. P. 215–222.
3. Williams M.I., Steadman D.W. The Historic and Prehistoric Distribution of Parrots (Psittacidae) in the West Indies // Biogeography of the West Indies: Patterns and Perspectives. 2nd ed. Eds. Wood C.A., Sergile F.E. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2001. P. 175–190.
4. Wiley J.W., Kirwan G.M. The Extinct Macaws of the West Indies, with Special Reference to Cuban Macaw *Ara Tricolor* // Bulletin of the British Ornithologists' Club. 2013. V. 133. № 2. P. 125–156.
5. Gala M., Lenoble A. Evidence of the Former Existence of an Endemic Macaw in Guadeloupe, Lesser Antilles // Journal of Ornithology. 2015. V. 156. № 4. P. 1061–1066.
6. Orihuela J. An Annotated List of Late Quaternary Extinct Birds of Cuba // Ornithologia Neotropical. 2019. V. 30. P. 57–67.
7. Barbour T. The Birds of Cuba. Cambridge, MA.: Nuttall Ornithological Club, 1923. 141 p.
8. Jiménez O., Orihuela J. New Findings of Birds in Paleontological and Archaeological Contexts of Cuba // Novitates Caribaea. 2021. V. 17. P. 163–176.
9. Suárez W., Díaz-Franco S. A New Fossil Bat (Chiroptera: Phyllostomidae) from a Quaternary Cave in Cuba // Caribbean Journal of Science. 2003. V. 39. P. 371–377.
10. Suárez W. The Enigmatic Snipe *Capella* sp. (Aves: Scolopacidae) in the Fossil Record of Cuba // Caribbean Journal of Science. 2004. V. 40. № 1. P. 155–157.
11. Suárez W., Díaz-Franco S. Estudio Paleontológico del Depósito Fosilífero El Abrón, Pinar del Río (Sinopsis de las Aves Fósiles de Cueva El Abrón, Pinar del Río, Cuba) // Biodiversidad Paleontológica del Archipiélago Cubano: Bases Cartográficas y Conservacionistas. Informe final del proyecto 022 AMA-CIT-MA; 074 MNHN. La Havana: Museo Nacional de Historia Natural Cubana, 2011. 13 p.
12. Зеленков Н.В., Гонсалес С.Ф. Первый ископаемый тоди (Aves: Todidae) на Кубе // Палеонтологический журнал. 2020. № 4. С. 93–98.
13. Syromyatnikova E., Aranda E., Fiol González S. First Insight into the Diversity of Snakes in the Pleistocene of Cuba // Acta Palaeontologica Polonica. 2021. V. 66. P. 395–407.
14. Zelenkov N.V., Gonzalez S.F. A New Extinct Species of *Margaryobas* (Strigiformes) and the Evolutionary History of the Endemic Cuban Bare-legged Owl (*M. Lawrencii*) // Journal of Vertebrate Paleontology. 2021. V. 41. P. e1995869. DOI: 10.1080/02724634.2021.1995869
15. Лопатин А.В. Смена зубов у Nesophontidae (Lipotyphla, Mammalia) из плейстоцена Кубы // Доклады РАН. Науки о жизни. 2023. Т. 497. С. 118–124.
16. Зеленков Н.В., Беличенко Е.С. Динамика авифауны западной Кубы в позднечетвертичное время (по материалам из пещеры Эль-Аброн) // Доклады РАН. Науки о жизни. 2022. Т. 503. С. 117–120.
17. Росина В.В., Лопатин А.В., Агаджанян А.К., Фиоль Гонсалес С. Новые находки рукокрылых (Chiroptera, Mammalia) в плейстоценовом местонахождении Эль-Аброн (Куба) // Палеонтологический журнал. 2023. № 1. С. 84–92.
18. Rojas Consuegra R., Pajón Morejón J.M., Aranda Pedroso E., et al. Estratigrafía del Yacimiento Cuaternario de Microvertebrados Fósiles El Abrón, en el Karst de Sierra La Güira, Provincia Pinar del Río, Cuba // Geociencias UO. 2022. V. 5. № 2. P. 102–113.
19. Bush M.B., Correa-Metrio A., Hodell D.A., et al. Re-evaluation of Climate Change in Lowland Central America during the Last Glacial Maximum Using New Sediment Cores from Lake Petén Itzá, Guatemala // Past Climate Variability from the Last Glacial Maximum to the Holocene in South America and Surrounding Regions / Eds. Vimeux F., Sylvestre F., Khodri M. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009. P. 113–128.
20. Warken S.F. Scholz D., Spötl Ch., et al. Caribbean Hydroclimate and Vegetation History across the Last Glacial Period // Quaternary Science Reviews. 2019. V. 218. P. 75–90.

CUBAN MACAW (*ARA TIRCOLOR*) IN THE UPPER PLEISTOCENE OF WESTERN CUBA

N. V. Zelenkov^{a, #}

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

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

Presented by Academician of the RAS A.V. Lopatin

The Cuban Macaw, *Ara tricolor* (Bechstein, 1811), is an extinct species of large parrots with little known historical distribution and ecology. To date, only three late Quaternary paleontological and one archaeozoological (17th–18th centuries) finds of the species have been described from central Cuba. This article describes the new (fourth) fossil record of the Cuban Macaw, a fragmentary carpometacarpus from the Upper Pleistocene layers of El Abrón Cave in Pinar del Río province. This is the first documented evidence of the species from the western part of Cuba. The associated fauna indicates that the Cuban Macaw lived in mosaic, semi-open marshy landscapes, probably similar to those in the vicinity of Ciénaga de Zapata in modern times.

Keywords: birds, extinct species, Psittacidae, West Indies, cave deposits, Pleistocene

УДК 599.426: 574.24: 591.11: 577.112.3

АМИНОКИСЛОТНЫЙ ФОНД СЫВОРОТКИ КРОВИ ЕВРОПЕЙСКИХ МИГРИРУЮЩИХ ВИДОВ РУКОКРЫЛЫХ: *VESPERTILIO MURINUS* (LINNAEUS, 1758) И *PIPISTRELLUS NATHUSII* (KEYSERLING ET BLASIUS, 1839), ОБИТАЮЩИХ НА УРАЛЕ

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

Поступило 08.02.2024 г.

После доработки 20.02.2024 г.

Принято к публикации 25.02.2024 г.

Исследован аминокислотный фонд свободных аминокислот в сыворотке крови двух европейских мигрирующих видов рукокрылых: *V. murinus* и *P. nathusii*, обитающих на Урале. Статистически значимые различия отмечены по формированию основных метаболических групп свободных аминокислот у сеголеток мигрирующих видов: ГЛАК, НАК, ЗАК, ССАК ($p < 0.05$). По содержанию метаболических групп в процентах от общего пула АК у сеголеток лесного нетопыря преобладают ГЛАК – 79.7% и НАК – 49.4%, а у двухцветного кожана ГЛАК – 74.9% и ЗАК – 58.4%. Сравнительный анализ показал отсутствие различий между *V. murinus* и *P. nathusii* по процентному содержанию АРАК и АКРУЦ ($p > 0.05$). Статистически значимые различия отмечены в формировании метаболических групп аминокислот в крови сеголетков мигрирующих видов рукокрылых и оседлого вида прудовых ночниц ($p < 0.05$).

Ключевые слова: летучие мыши, мигрирующие и оседлые виды рукокрылых, аминокислоты

DOI: 10.31857/S2686738924030046, **EDN:** VUDULU

ВВЕДЕНИЕ

Фаунистический комплекс рукокрылых Уральского региона включает типично европейские виды: *P. nathusii* и *V. murinus*, обитающие в короткий летний период в регионе с континентальным климатом, но совершающие сезонные дальние миграции от летних убежищ к местам зимовки [1, 2]. И, если районы размножения двухцветных кожанов и лесных нетопырей приурочены географически к северо-восточным и восточным местам обитания, то пути мигрирующих популяций этих видов в районы зимовки пролегают в южном и юго-западном направлениях [3–6]. Протяженность миграционных путей может достигать 3000–4000 км [7, 8]. Основными движущими силами миграции являются экологические и биогеографические факторы, такие как сезонность, про-

странственно-временное распределение ресурсов, среда обитания в условиях глобальных изменений, хищничество и конкуренция [9]. Экстремальные климатические флуктуации, нарушая или изменяя фенологию миграционного поведения рукокрылых, активно влияют на их выживание и размножение [10]. Миграционный период летучих мышей представляет собой одну из наиболее серьезных физиологических проблем, учитывая, что в жизни животных стратегия миграции требует повышенных энергетических затрат [11].

Исследования эколого-физиологических процессов, обеспечивающих миграционную стратегию и устойчивость адаптации мигрирующих видов рукокрылых к биотическим и абиотическим факторам среды, имеют решающее значение при разрешении проблем как сохранения биоразнообразия и рационального использования ресурсов животного мира, так и при осуществлении долговременного мониторинга численности и устойчивости популяций рукокрылых. Авторами ранее показано, что летучие мыши, как и все позвоночные, обладающие достаточно развитой кровеносной и иммунной системами, демонстрируют реакцию на воздействие широкого спектра факторов окружающей среды [12, 13]. Поскольку особое значение в поддержании гомеостаза

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

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

приобретает оптимальное состояние аминокислотного пула, защищающего организм от повреждения и обеспечивающего возможности энергетического и пластического обмена, цель данного исследования — оценка фонда свободных аминокислот крови мигрирующих видов летучих мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отлов и содержание животных ($n = 34$) в лаборатории осуществлялись с соблюдением международных принципов Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным, используемых для экспериментальных и научных целей [14]. Протоколы с использованием экспериментальных животных утверждены комиссией по биоэтике Института экологии растений и животных УрО РАН (протокол № 11 от 29.04.2022). Животные отловлены паутинными сетями во второй декаде июля — в период выведения потомства на побережье оз. Большой Кисегач (Челябинская область).

Исследуемая группа животных представлена сеголетками двух видов летучих мышей, совершающих дальние сезонные миграции: нетопырь лесной (*P. nathusii*) — перелетный вид, обитающий в лесной и лесостепной зонах Южного Урала и по всему региону, и двухцветный кожан (*V. murinus*) — перелетный и широко распространенный на Урале вид [1]. Для сравнения использовали прудовую ночницу (*Myotis dasycneme*, Voie, 1825) — оседлый вид, формирующий крупные выводковые колонии на Среднем и Южном Урале [1]. Животных без признаков заболеваний доставляли в лабораторию в отдельных контейнерах в день отлова.

Учитывая функциональную роль свободных аминокислот (АК) в регуляции основных метаболических процессов биосинтеза белка, нуклеиновых кислот, гормонов, а также в иммунологических процессах [15], оценка состояния аминокислотного фонда в тканях летучих мышей позволяет оценить его значение в адаптационных возможностях мигрирующих видов при перманентных климатических флуктуациях в местах обитания. Методы пробоподготовки и выполнения анализа свободных аминокислот в сыворотке крови летучих мышей с помощью ионообменной жидкостной хроматографии на автоматическом анализаторе ААА-339М (Mikrotechna, Чехия) подробно описаны в работе [16]. Рассчитывали суммарные концентрации и процентное содержание заменимых аминокислот (ЗАК): аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, глутамин, глутаминовая кислота, глицин, серин, тирозин, цистеин, пролин; незаменимых (НАК): треонин, валин, лизин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, аргинин, гистидин, триптофан; гликогенных (ГГАК): глицин, треонин, глутаминовая кислота и глутамин, аланин, аргинин,

гистидин, серин, валин, аспарагин и аспарагиновая кислота, цистеин, метионин, триптофан, пролин; серосодержащих (ССАК): цистеин, метионин, таурин; АК с разветвленной углеродной цепью (АКРУЦ): валин, лейцин, изолейцин; ароматических аминокислот (АРАК): фенилаланин, тирозин. Выполнен анализ 384 аминокислотных проб. 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” [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Качественный состав аминокислотного спектра сыворотки крови исследуемых рукокрылых представлен 22 АК. По суммарной концентрации эссенциальных и заменимых аминокислот значимых различий между самками и самцами subadultus не отмечено ($p < 0.05$). Суммарный вклад свободных АК в сыворотке крови мигрирующего вида лесного нетопыря 2701.3 ± 555.4 мкмоль/л, что в 1.8 раза выше, чем у двухцветного кожана 1488.5 ± 161.7 мкмоль/л и в 2.9 раза выше, чем у оседлого вида — прудовой ночницы 934.7 ± 67.7 мкмоль/л (табл. 1). Повышенный фонд АК обеспечивает как субстратную поддержку обменных процессов, так и участие в формировании иммунной системы летучих мышей, мигрирующих на дальние расстояния. По содержанию метаболических групп в процентах от общего пула АК у лесного нетопыря преобладают ГГАК — 79.7% и НАК — 49.4%, а у двухцветного кожана ГГАК — 74.9% и ЗАК — 58.4% в сравнении с прудовыми ночницами (табл. 1).

Отмечены значимые видовые различия и в процентном отношении по содержанию метаболической группы — серосодержащих аминокислот у *P. nathusii* и *V. murinus* ($p = 0.01$) (рис. 1). В сыворотке крови лесного нетопыря и двухцветного кожана отсутствуют значимые различия по содержанию АК с разветвленной углеродной цепью ($p = 0.23$) и ароматических АК ($p = 0.11$), являющихся как дополнительным источником энергии и обладающих иммуномодулирующими свойствами, так и энергетическими субстратами для синтеза биологически активных веществ и медиаторов, что, несомненно, отражает единство специфических путей метаболизма мигрирующих рукокрылых (рис. 1). Высокий уровень метаболически активного гликогенного пула *P. nathusii* (2147 мкмоль/л) и *V. murinus* (1114 мкмоль/л) демонстрирует потребность перелетных летучих мышей в энергетических субстратах на поддержание гомеостаза, обеспечивающего гормональную поддержку роста, развития и репродуктивных функций животных (рис. 1). Суммарный вклад гликогенных аминокислот лизина и глицина, необходимых для стимуляции гормона роста и ускоренного заживления

Таблица 1. Метаболические группы АК (%) и содержание свободных аминокислот (мкмоль/л) в сыворотке крови летучих мышей

АК, %	I. <i>V. murinus</i>	II. <i>P. nathusii</i>	III. <i>M. dasycneme</i>	<i>Permutation ANOVA</i> <i>Permutation Tukey's</i>		
	$\bar{X}_{boot} \pm SE_{boot}$ [95% CI _{boot}]			I–II	I–III	II–III
Гликогенные (ГТАК)	74.89 ± 1.02 [72.85–76.79]	79.69 ± 0.40* [78.95–80.50]	64.01 ± 2.9* ^a [57.51–69.81]	Pr(F _{ran} ≥ 20.77) = 0.0001 0.01 0.01 0.02		
Заменимые (ЗАК)	58.36 ± 1.34 [55.70–60.86]	44.37 ± 2.24* [40.55–49.04]	47.93 ± 2.73* [41.84–53.43]	Pr(F _{ran} ≥ 14.07) = 0.001 0.002 0.01 0.42		
Незаменимые (НАК)	32.02 ± 1.65 [28.84–35.26]	49.42 ± 2.97* [43.43–54.66]	37.01 ± 0.97 [35.07–39.17]	Pr(F _{ran} ≥ 15.29) = 0.001 0.002 0.15 0.03		
Серосодержащие (ССАК)	8.99 ± 0.53 [7.95–10.04]	6.02 ± 0.67* [4.56–7.17]	14.44 ± 1.81* ^a [10.75–18.46]	Pr(F _{ran} ≥ 14.43) = 0.0001 0.01 0.02 0.02		
С разветвленной углеродной цепью (АКРУЦ)	6.43 ± 1.01 [4.55–8.50]	8.51 ± 1.15 [4.97–12.02]	15.18 ± 0.56* ^a [14.05–16.42]	Pr(F _{ran} ≥ 12.13) = 0.002 0.23 0.01 0.02		
Ароматические (АРАК)	4.75 ± 0.64 [3.53–6.02]	3.03 ± 0.46 [2.15–3.97]	7.92 ± 0.68* ^a [6.54–9.44]	Pr(F _{ran} ≥ 8.17) = 0.01 0.11 0.05 0.02		
Фонд свободных АК, мкмоль/л	1488.5 ± 161.7 [1206.8–1834.3]	2701.3 ± 555.4 [1614.7–3781.7]	934.7 ± 67.7* ^a [790.4–1079.0]	Pr(F _{ran} ≥ 4.83) = 0.02 0.05 0.05 0.04		

Примечание: * – статистически значимые различия: I и II, I и III ($p < 0.05$); ^a – 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.

ран, в крови перелетных видов составляет у *V. murinus* (323.3 мкмоль/л) и *P. nathusii* (394.6 мкмоль/л), что более чем в 2 раза превышает содержание этих АК у представителя оседлого вида (163.7 мкмоль/л). Лизин, выступающий в качестве антиоксиданта, участвует в регуляции иммунологических функций и в процессах детоксикации ксенобиотиков [15]. Сравнительный анализ показал в сыворотке крови повышенное (в 2 раза) суммарное содержание АК (глицин, глутаминовая кислота и цистеин), обеспечивающих биосинтез трипептида – глутатиона, участвующего в детоксикации продуктов метаболизма перелетных видов летучих мышей в сравнительном варианте с прудовой ночницей [18].

Следует отметить у животных наличие полного спектра функционально значимых незаменимых АК. У лесного нетопыря в сыворотке крови содержание изолейцина в 2.6 раза, триптофана в 3.1 раза, аргинина в 8.0 раз, валина в 3.7 раза, лейцина в 2.2 раза выше, чем у двухцветного кожана. Аминокислоты с разветвленной углеродной цепью: валин, изолейцин, лейцин участвуют в синтезе белка, способствуют восстановлению костной и мышечных тканей

и поддержанию метаболических процессов в мышцах животных при длительных перелетах [15]. Повышенное содержание треонина (в 2.1–2.6 раза) наблюдали в крови исследованных перелетных видов: двухцветного кожана (103.2 мкмоль/л) и лесного нетопыря (130.8 мкмоль/л) по сравнению с прудовой ночницей (49.4 мкмоль/л). Треонин, принимая участие в синтезе коллагена и эластина, обеспечивает комплексное восстановление поврежденных мышечных волокон. Содержание аргинина (84.3 мкмоль/л) в сыворотке крови у двухцветного кожана в 6 раз выше, чем у ночницы прудовой (14.4 мкмоль/л), а в плазме крови нетопыря лесного содержание аргинина (686.2 мкмоль/л) составляет 25.4% от фонда свободных АК. Как незаменимая аминокислота, аргинин увеличивает мышечную массу и уменьшает объем жировой ткани, способствуя нормализации состояния соединительной ткани рукокрылых при подготовке к длительному сезонному полету [19]. Повышенное содержание аргинина сопровождается стимуляцией фагоцитарной активности нейтрофилов и образованием ряда цитокинов [20]. Повышенное содержание отмечено в сыворотке крови *V. murinus* и *P. nathusii* триптофана, влияющего на углеводный обмен

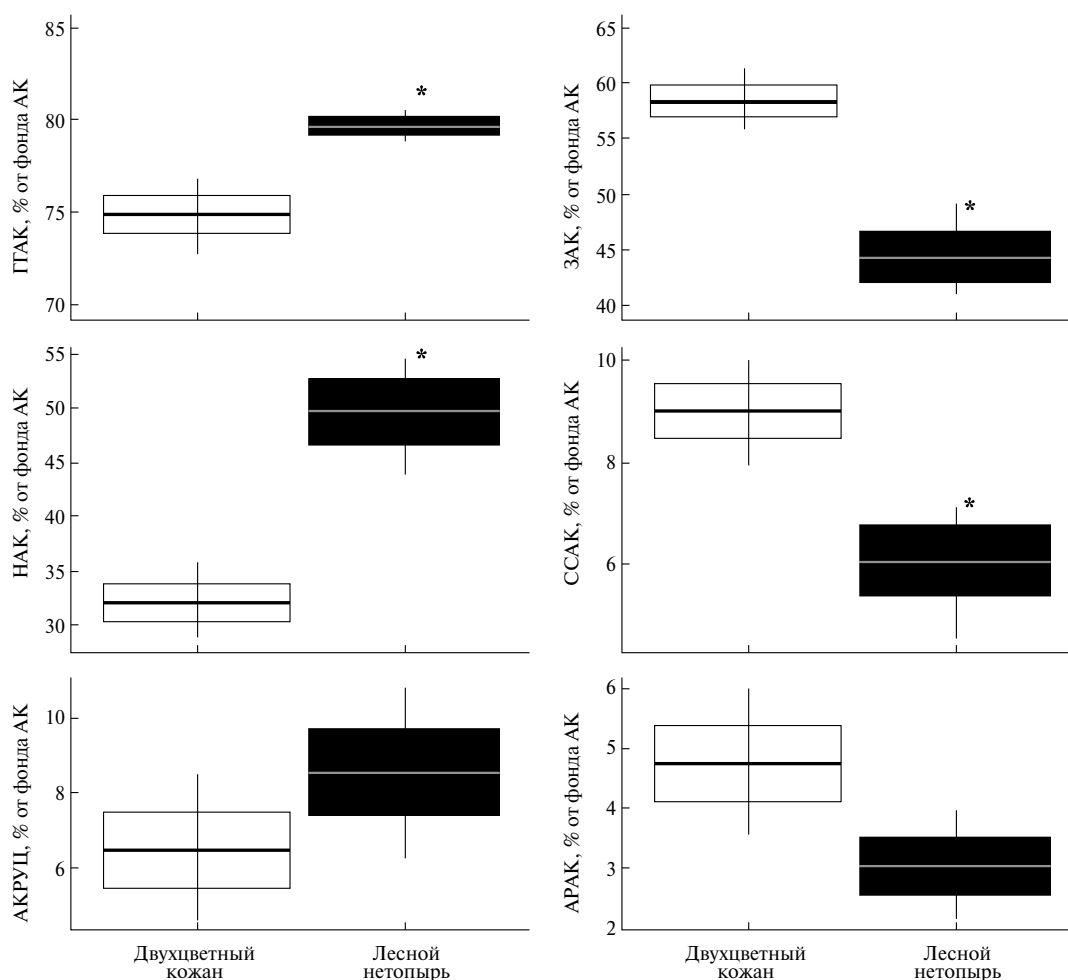


Рис. 1. Содержание метаболитических групп аминокислот (% от суммарного фонда) в сыворотке крови перелетных видов летучих мышей. Середина боксплота — среднее арифметическое, границы боксплота — ошибка среднего, “усы” боксплота — доверительный интервал бутстреп-распределения; * — статистически значимые различия между группами “двухцветный кожан” — “лесной нетопырь”.

в организме и модулирующего иммунологические функции через ряд метаболитов, включая серотонин и мелатонин [15, 19]. Наряду с выявленными единичными закономерностями метаболизма функционально значимых АК при поддержании гомеостаза, показана и определенная разнонаправленность в мобилизации механизмов аварийного регулирования аминокислотного фонда мигрирующих и оседлых летучих мышей. Опираясь на публикации исследователей и полученные нами результаты, можно полагать, что формирование фонда свободных аминокислот и их дериватов у летучих мышей регламентировано биотическими и абиотическими факторами среды.

Метод многомерного анализа (РСА) плазмы крови позволяет визуализировать степень содержания метаболитических групп свободных аминокислот, модифицирующих основные метаболитические

потoki в организме трех видов рукокрылых, обитателей уральской фауны, подтверждая результаты представленного исследования (рис. 2). При 95% доверительном интервале показано, что 52.2% общей дисперсии метаболитических групп аминокислотного фонда плазмы крови рукокрылых приходится на первую главную компоненту (*PC1*), а 35.6% — на вторую (*PC2*) (рис. 2). По представленным переменным первая и вторая главные компоненты обуславливают значимую пространственную дифференциацию основных метаболитических групп аминокислот крови двухцветного кожана и лесного нетопыря относительно прудовой ночницы. Первая компонента разделяет кластер прудовой ночницы и группы двухцветного кожана и лесного нетопыря. Показаны высокие коэффициенты корреляции с *PC1* и значимый вклад в компоненту ГТАК (31.44%), ССАК (25.2%), АРАК (23.20%), АКРУЦ (17.80%) (рис. 2).

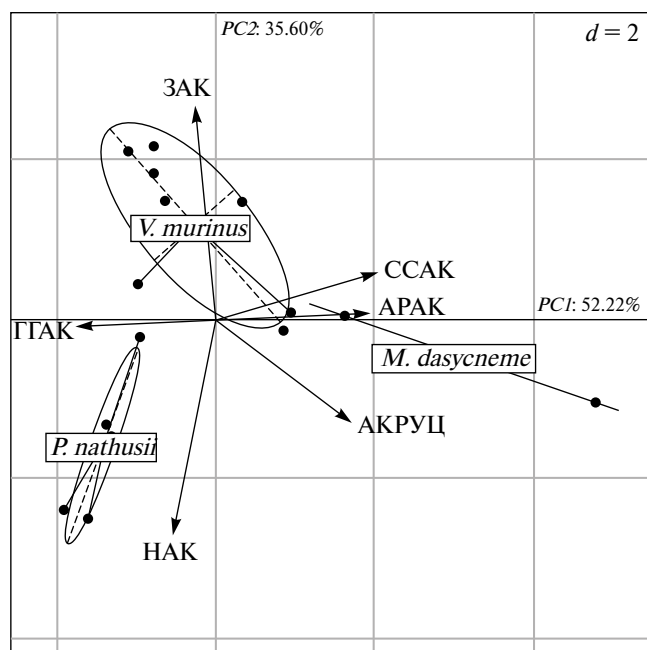


Рис. 2. Метаболические группы аминокислот сыворотки крови (% от общего фонда АК) летучих мышей в пространстве первых двух главных компонент. $PC1$, $PC2$ — оси главных компонент, % — процент дисперсии данных, объясненных главной компонентой; стрелки отражают корреляцию главных компонент с исходными показателями; эллипсы представляют собой 95% доверительные области.

Большой процент гликогенных аминокислот приходится в основном на двухцветного кожана и лесного нетопыря (рис. 2). Значимый вклад во вторую главную компоненту отмечен для ЗАК (44.36%) и НАК (43.39%) при достаточно высоких коэффициентах корреляции с $PC2$. Вторая главная компонента четко разделяет группировки двухцветного кожана и лесного нетопыря. Заменяемые аминокислоты преобладают в сыворотке крови двухцветного кожана, незаменимые — у лесного нетопыря (рис. 2).

В исследовании наследственно обусловленных модуляций свободных аминокислот как необходимого энергетического и пластического фонда в сыворотке крови летучих мышей выявлены существенные резервные возможности азотистого метаболизма мигрирующих видов: двухцветного кожана и лесного нетопыря. Проиллюстрирована определяющая роль гликогенных аминокислот (ГГАК) и пула незаменимых АК, способствующих высокой резистентности организма к сезонной изменчивости ежегодного жизненного цикла в период длительной трансконтинентальной миграции.

Можно предположить, что видовая специфика метаболических групп свободных аминокислот сыво-

ротки крови двухцветного кожана и лесного нетопыря обеспечивает миграционную стратегию и адаптивную устойчивость животных как к выживанию при длительных сезонных перелетах, так и их успешному освоению новых мест обитания.

Таким образом, полученные результаты исследований параметров аминокислотного спектра сыворотки крови двухцветного кожана и лесного нетопыря могут быть приняты в качестве референтных при мониторинге популяций перелетных видов летучих мышей и при их использовании как видов-биоиндикаторов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность с.н.с. Южно-Уральского федерального научного центра минералогии и геоэкологии УрО РАН, к.б.н. Снитыко В.П. за существенную помощь во время проведения полевых исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

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 осуществлялись с соблюдением международных принципов Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным, используемых для экспериментальных и научных целей [14]. Протокол с использованием экспериментальных животных был одобрен комиссией по биоэтике Института экологии растений и животных УрО РАН (протокол № 11 от 29.04.2022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Большаков В.Н., Орлов О.Л., Снитыко В.П. Летучие мыши Урала. Екатеринбург: Академкнига, 2005.
2. Strelkov P.P. Seasonal Distribution of Migratory Bat Species (Chiroptera, Vespertilionidae) in Eastern Europe and Adjacent Territories // Myotis. 1999. V. 37. P. 7–25.
3. Fleming T.H., Eby P. Ecology of Bat Migration // Bat ecology (Kunz T. H., Fenton M. B., eds.). Chicago, Illinois: University of Chicago Press, 2003. P. 156–208.
4. Dietz C., Kiefer A. Bats of Britain and Europe. London: Bloomsbury Publishing, 2016.
5. Petersons G. Seasonal Migrations of North-Eastern Populations of *Nathusius' Bat Pipistrellus Nathusii* (Chiroptera) // Myotis. 2004. V. 41–42. P. 29–56.

6. *Sachanowicz K., Ciechanowski M., Tryjanowski P., et al.* Wintering Range of *Pipistrellus Nathusii* (Chiroptera) in Central Europe: Has the Species Extended to the North-East Using Heat Islands? // *Mammalia*. 2018. V. 83(3). P. 260–271.
7. *Alcalde J. T., 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.
8. *Vasenkov D., Sidorchuk N., Desmet J. F., 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.
9. *Alerstam T., Hedenström A., Åkesson S.* Long-distance Migration: Evolution and Determinants // *Oikos*. 2003. V. 103(2). P. 247–260.
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 Animal Ecology*. 2010. V. 79(1). P. 128–136.
11. *Maggini I., Noakes M.J., Hawke L.A., et al.* Ecophysiological Adaptations Associated with Animal Migration // *Frontiers in Ecology and Evolution. Behavioral and Evolutionary Ecology*. 2022. V. 10. P. 1–5.
12. *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.
13. *Ковальчук Л.А., Мищенко В.А., Черная Л.В. и др.* Особенности иммуногематологических параметров перелетного (*Vespertilio murinus* Linnaeus, 1758) и оседлого (*Myotis dasycneme* Boie, 1825) видов рукокрылых фауны Урала // Доклады РАН. Науки о жизни. 2021. Т. 501. № 6. С. 543–546.
14. *Yarri D.* The Ethics of Animal Experimentation. Oxford: Oxford University Press, 2005.
15. *Гараева С.Н., Редкозубова Г.В., Постолати Г.В.* Аминокислоты в живом организме. Кишнев: Типография Академии Наук Молдовы, 2009.
16. *Ковальчук Л.А., Мищенко В.А., Черная Л.В. и др.* Эколого-физиологические параметры *Myotis dasycneme* (Mammalia: Chiroptera: Vespertilionidae) фауны Урала // Nature Conservation Research. Заповедная наука. 2023. Т. 8(4). С. 94–111.
17. *Chessel D., Dufour A.B., Thioulouse J.* The ade4 package – I: One-table methods // *R News*. 2004. № 4. P. 5–10.
18. *Forman H.J., Zhang H., Rinna A.* Glutathione: Overview of its Protective Roles, Measurement, and Biosynthesis // *Molecular Aspects of Medicine*. 2009. V. 30(1–2). P. 1–12.
19. *Wu G.* Functional Amino Acids in Growth, Reproduction, and Health // *Advances in Nutrition*. 2010. V. 1(1). P. 31–37.
20. *Barbul A.* Arginine and Immune Function // *Nutrition*. 1990. V. 6(1). P. 53–62.

AMINO ACID FUND OF BLOOD SERUM OF EUROPEAN MIGRATING SPECIES OF CHIROPTERA: *VESPERTILIO MURINUS* (LINNAEUS, 1758) AND *PIPISTRELLUS NATHUSII* (KEYSERLING ET BLASIUS, 1839) OF THE URAL FAUNA

L. A. Kovalchuk^{a, #}, V. A. Mishchenko^{a, b}, L. V. Chernaya^a,

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*

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

The amino acid pool of free amino acids in the blood serum of two European migratory bat species: *V. murinus* and *P. nathusii* living in the Urals was studied. Statistically significant differences were noted in the formation of the main metabolic groups of free amino acids in yearlings of migratory species: GGAA, NEAA, EAA, SAA ($p < 0.05$). In yearlings of the *P. nathusii*: GGAA predominates – 79.7% and EAA – 49.4%, and in the yearlings of the *V. murinus*: GGAA predominates – 74.9% and NEAA – 58.4%. Comparative analysis showed no differences between *V. murinus* and *P. nathusii* in the percentage of AAA and BCAA ($p > 0.05$). Statistically significant differences were noted in the formation of metabolic groups of amino acids in the blood of yearlings of migratory species of bats and the resident species of pond bat ($p < 0.05$).

Keywords: bats, migratory and resident species, amino acids

УДК 569.426:551.793(477.75)

PLECOTUS MACROBULLARIS SARMATICUS SUBSP. NOV. (VESPERTILIONIDAE, CHIROPTERA) ИЗ РАННЕГО ПЛЕЙСТОЦЕНА КРЫМА

© 2024 г. Академик РАН А. В. Лопатин^{1,*}

Поступило 01.03.2024 г.

После доработки 05.03.2024 г.

Принято к публикации 06.03.2024 г.

По челюстным остаткам из нижнего плейстоцена пещеры Таврида в центральном Крыму описан вымерший горный ушан *Plecotus macrobullaris sarmaticus* subsp. nov. Это первая находка рода *Plecotus* в нижнем плейстоцене России и первая ископаемая находка *P. macrobullaris* Kuzyakin, 1965, документирующая раннюю стадию эволюционной истории вида.

Ключевые слова: *Plecotus macrobullaris*, горный ушан, рукокрылые, ранний плейстоцен, Крым

DOI: 10.31857/S2686738924030053, **EDN:** VUBNIM

Ушаны — летучие мыши рода *Plecotus*, представлены в современной фауне двумя десятками видов, обитающими в Евразии и северной Африке [1, 2]. Характерный внешний облик (прежде всего, огромные уши) долгое время воспринимался как надежный отличительный признак и одновременно свидетельство видовой однородности европейских ушанов, из-за чего все их популяции относились к *P. auritus* (Linnaeus, 1758), типовому виду рода. В настоящее время, помимо *P. auritus*, в Европе распознаются *P. austriacus* (Fischer, 1829), *P. kolombatovici* Dulić, 1980, *P. macrobullaris* Kuzyakin, 1965 (с двумя подвидами и *P. sardus* Mucedda et al., 2002 [1, 2]. *P. auritus*, *P. macrobullaris* и *P. sardus* вместе с азиатскими видами объединяются в группу *P. auritus*, тогда как *P. austriacus*, *P. kolombatovici* и африканские виды относятся к группе *P. austriacus* [1].

В палеонтологической летописи Европы род *Plecotus* представлен с раннего миоцена (*P. schoepfelii* Rosina et Rummel, 2012 из териюзоны MN3 Германии) [3]. Для позднего миоцена (MN13) характерен *P. atavus* Topál, 1987, для раннего плиоцена (MN14) — *P. rabederi* Wołoszyn, 1987 [4, 5]. Два последних вида вместе с плио-плейстоценовым *P. crassidens* Kormos, 1930 сближаются с североамериканским родом *Corynorhinus* и иногда рассматриваются в его составе [1, 5] либо выделяются в подрод *Paraplecotus* [6] внутри *Plecotus* (см. [7]).

Близкими современным видам *Plecotus* считаются раннеплиоценовый (MN15) *P. pliocaenicus* Topál, 1989 и плейстоценовый *P. abeli* Wettstein, 1923. Первый из них рассматривается как возможный предок всех ныне живущих ушанов [5], тогда как второй либо считается предковой формой *P. auritus* [6], либо сближается с *P. macrobullaris* [1]. При этом большинство остатков *Plecotus* из среднего и верхнего плейстоцена Европы отнесены к *P. auritus*, тогда как *P. austriacus* определен лишь из нескольких местонахождений Испании, Майорки и Болгарии [8, 9]. Палеонтологическая летопись *P. macrobullaris* (= *P. alpinus* Kiefer et Veith, 2001; = *P. microdontus* Spitzenberger in Spitzenberger et al., 2002) до настоящего времени отсутствовала; судя по его современному распространению и генетическому разнообразию популяций, возможным первоначальным ареалом этого вида был Ближний Восток [10, 11]. В этой связи большое значение имеют данные об ископаемых находках *Plecotus* в указанном регионе и прилегающей к нему Понто-Каспийской области. К их числу относятся описываемые ниже остатки *Plecotus macrobullaris sarmaticus* subsp. nov. из раннеплейстоценового местонахождения Таврида в центральном Крыму.

Раннеплейстоценовая ассоциация рукокрылых из пещеры Таврида (Республика Крым, Белогорский район, пос. Зуя) включает *Rhinolophus macrorhinus cimmerius* Lopatin, 2022, *R. mehelyi scythotauricus* Lopatin, 2023, *Eptesicus praeglacialis* Kormos, 1930 и *E. nilssonii varangus* Lopatin, 2023 [12–15], а также представителей родов *Myotis*, *Vespertilio* и *Plecotus* [13, 15]. Фаунистический комплекс местонахождения Таврида датирован поздним виллафранком

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

*e-mail: alop@paleo.ru

(около 1.8–1.5 млн л.н.) [16] и может быть сопоставлен с ранним бихарием (MQ1).

Изученные образцы из пещеры Таврида хранятся в Палеонтологическом институте им. А.А. Борисяка РАН (ПИН) в г. Москве. Для сравнения использовались современные материалы из коллекции Зоологического музея Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (ЗМ МГУ). Измерения сделаны при помощи окуляр-микрометра стереомикроскопа Leica MZ6, приведены в мм. Иллюстрации получены с помощью сканирующего электронного микроскопа Tescan Vega 3 ХМУ и рентгеновского микрофотографа Neoscan N80 в ПИН.

Отряд Chiroptera Blumenbach, 1779

Семейство Vespertilionidae Gray, 1821

Подсемейство Vespertilioninae Gray, 1821

Триба Plecotini Gray, 1866

Род *Plecotus* Geoffroy, 1818

Plecotus macrobullaris Kuzyakin, 1965

Plecotus macrobullaris sarmaticus Lopatin, subsp. nov.

Название подвида — лат. сарматский, по древнему народу сарматов.

Голотип — ПИН, № 5644/652; левая нижнечелюстная кость с P_4 – M_3 ; Россия, Республика Крым, Белогорский район, пещера Таврида (вблизи точки “Ванин грот”); нижний плейстоцен.

Описание (рис. 1–3). Размеры относительно крупные, сравнимые с *P. austriacus*. Подглазничное отверстие овальной формы, расположено целиком над M^1 ; передний край отверстия находится на уровне складки паракона, а задний — над серединой зуба, несколько дистальнее уровня вершины мезостилия (рис. 1а). Нижний край подглазничного отверстия расположен существенно выше нижнего края глазницы. Предглазничный мостик (костный мостик между подглазничным отверстием и передним краем глазницы) узкий.

M^1 слабо расширен поперечно (рис. 1б). Задний край коронки прямой, без выемки. Метакон значительно выше и шире паракона (соотношение ширины паракона и метакона — 0.79). Мезостиль достигает уровня лабиального края складки метакона. Метакриста ориентирована постеролабиально, складка метакона широкая. Лингвальная доля сравнительно короткая. Вершина протокона поперечно противопоставлена вершине паракона. Комплекс протокона угловатый, постпротокриста ориентирована продольно. Дистальный конец постпротокристы низкий, немного не достигает лингвального основания метакона. Цингулюм хорошо развит почти по всему периметру коронки, но отсутствует у парастилия, мезостилия и метастилия; на уровне постпротокристы

цингулюм отчетливо утолщенный, у лабиального края складки паракона — бугорчатый, у лабиального края складки метакона — тонкий, слегка волнистый.

Горизонтальная ветвь нижнечелюстной кости длинная, сравнительно высокая и толстая, с отчетливым подбородочным выступом (рис. 2). Вентральный край в целом прямой, чуть вогнутый под P_4 и немного выпуклый под M_3 . На всех трех изученных экземплярах имеется по два подбородочных отверстия: более мелкое переднее расположено под клыком (в интервале от I_3/C_1 до C_1/P_2), крупное заднее — под P_2 или промежутком P_2/P_3 . Под промежутком I_1/I_2 находится еще одно мелкое отверстие удлиненно-овальной формы (вытянутое субвертикально). Симфизный отдел высокий и длинный, достигает уровня задней части C_1 или передней части P_2 .

Передний край основания венечного отростка пологий, с крупным треугольным бугорком в медиальной (лингвальной) части, продолжающимся дорсально резким гребнем (рис. 3е) или высоким гребневидным утолщением (рис. 3б). Верхняя часть венечного отростка ориентирована вертикально и слегка выступает мезиально. Вершина венечного отростка заостренная, задний край пологий (у голотипа с небольшим зубцом посередине, см. рис. 3а, 3б), вырезка (прогиб) между венечным и сочленовным отростками слабая. Венечный гребень мощный, латеральная (лабиальная) сторона венечного отростка уплощенная. Массетерная впадина глубокая, с крупным сквозным сосудистым отверстием в центральной части (его выход на медиальной стороне сближен с нижнечелюстным отверстием, см. рис. 2а, 2в, 2ж, 2и) или без него (рис. 2г, 2е). Медиальная сторона венечного отростка отчетливо вогнутая, мышечловый гребень умеренно развитый. Нижнечелюстное отверстие овальное, узкое, обращено дистально и с меди-

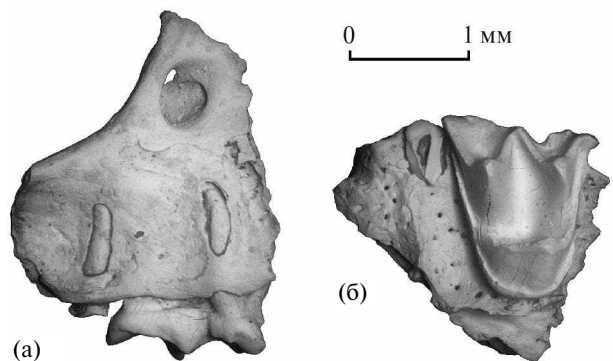


Рис. 1. *Plecotus macrobullaris sarmaticus* Lopatin subsp. nov., экз. ПИН, № 5644/651, фрагмент правой верхнечелюстной кости с M^1 (СЭМ): а — с лабиальной стороны, б — с окклюзионной стороны; Россия, Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен.

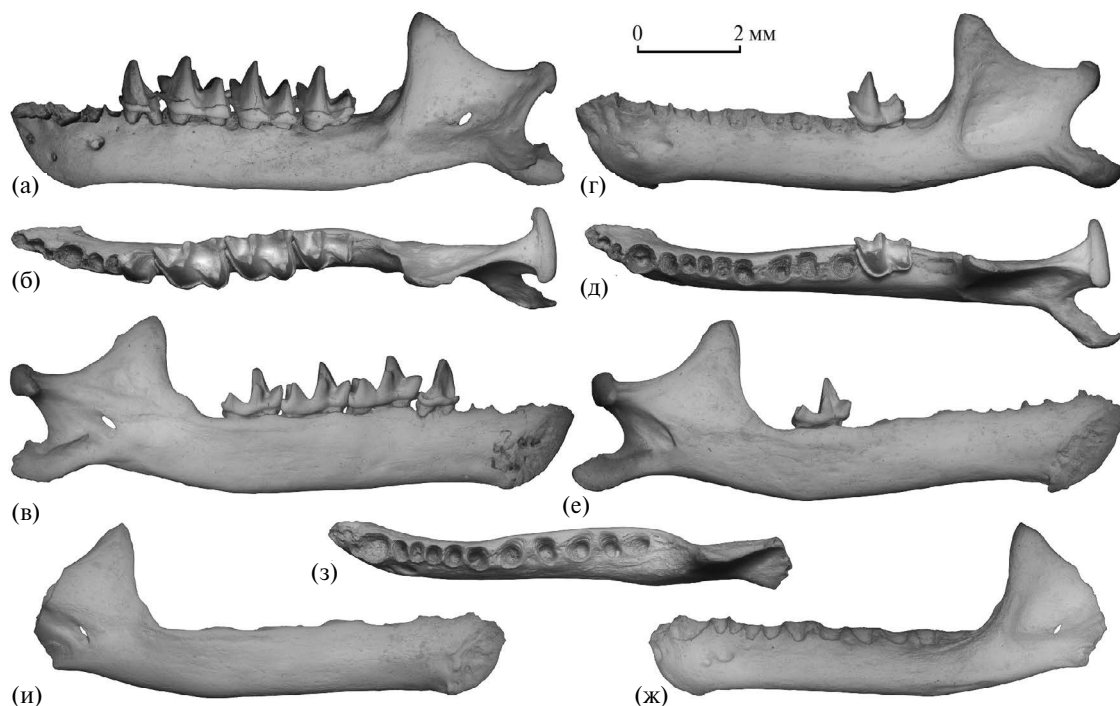


Рис. 2. *Plecotus macrobullaris sarmaticus* Lopatin, subsp. nov. (СЭМ): а–в — голотип ПИН, № 5644/652, левая нижнечелюстная кость с P_4 – M_3 : а — с лабиальной стороны, б — с окклюзиальной стороны, в — с лингвальной стороны; г–е — экз. ПИН, № 5644/653, левая нижнечелюстная кость с M_3 : г — с лабиальной стороны, д — с окклюзиальной стороны, е — с лингвальной стороны; ж–и — экз. ПИН, № 5644/654, левая нижнечелюстная кость без зубов: ж — с лабиальной стороны, з — с окклюзиальной стороны, и — с лингвальной стороны; Россия, Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен.

альной стороны полностью скрыто костной стенкой. Суставный мыщелок широкий, его медиальная часть заметно короче и ниже латеральной. Вырезка между сочленовным и угловым отростками глубокая. Вентральная вырезка перед угловым отростком (*incisura angularis* [17] seu *inc. praeangularis* [18] seu *inc. vasorum* [5]) плавная. Спереди от этой вырезки на вентральной стороне нижнечелюстной кости (на уровне от середины M_3 до передней части венечного отростка) имеется уплощенная узкая область для прикрепления двубрюшной мышцы.

Угловой отросток мощный, длинный, широкий в основании, сильно выступает назад (оканчивается несколько дистальнее уровня суставного мыщелка) и значительно отогнут латерально. Угловой отросток лопастевидной формы, с выпуклой латеральной стороной, отчетливо вогнутой медиальной поверхностью и узкой, но закругленной вершиной. Дорсальный край углового отростка волнистый или зазубренный, на голотипе — с хорошо выраженным рогаобразным выступом в средней части (рис. 3а, 3б). На латеральной стороне углового отростка выпуклая концевая часть тонким субпоперечным (относительно длинной оси отростка) гребнем отделена от уплощенного

основания, на котором имеется мощный продольный гребень (*linea masseterica*, см. [5]). Вогнутая площадка в основании медиальной стороны углового отростка (для прикрепления медиальной крыловидной мышцы) довольно широкая; дорсально она ограничена высоким и резким костным гребнем, который протягивается постероventрально от впадины позади нижнечелюстного отверстия до нижнего края вырезки между сочленовным и угловым отростками, оканчиваясь под дорсальным выступом углового отростка (рис. 3б, 3е). Передний конец этого гребня высокий, с зубовидным выростом.

Нижний зубной ряд состоит из трех резцов, клыка, двух малых премоляров P_2 и P_3 (известны по альвеолам), большого премоляра P_4 и трех моляров миотодонтного строения. Альвеолы нижних резцов мелкие, альвеола I_3 смещена лабиально относительно альвеол I_1 и I_2 . Альвеола нижнего клыка C_1 крупная, округлая, примерно вдвое длиннее альвеол P_2 и P_3 . Альвеолы премоляров расположены в одну линию, без лабиального смещения. Альвеола P_2 немного шире альвеолы P_3 .

P_4 высокий, довольно короткий, задняя часть коронки отчетливо шире передней. Основание коронки

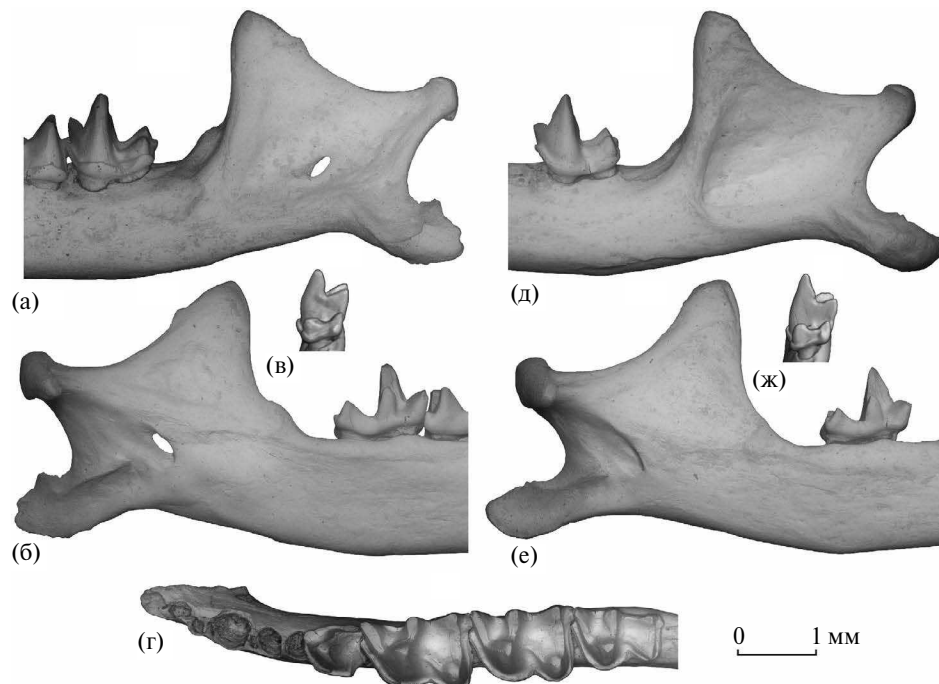


Рис. 3. *Plecotus macrobullaris sarmaticus* Lopatin, subsp. nov.: а–г — голотип ПИН, № 5644/652, левая нижнечелюстная кость с P_4 – M_3 ; а — восходящая ветвь с лабиальной стороны, б — восходящая ветвь с лингвальной стороны, в — M_3 с задней стороны, г — горизонтальная ветвь с P_4 – M_3 с окклюзионной стороны; д–ж — экз. ПИН, № 5644/653, левая нижнечелюстная кость с M_3 ; д — восходящая ветвь с лабиальной стороны, е — восходящая ветвь с лингвальной стороны, ж — M_3 с задней стороны (а, б, г–е — СЭМ; в, ж — компьютерные модели); Россия, Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен.

округленно-трапецевидное, с непрерывным мощным цингулидом (на голотипе сильно стерт в постеролабиальном углу, см. рис. 2а, 2б, 3г). Передний (антеролингвальный) дополнительный бугорок мелкий, слабо выступающий, занимает антеролингвальное положение (однако виден с лабиальной стороны). Постеролингвальный дополнительный бугорок хорошо развитый, сильно выступающий, соединен с постеролингвальным ребром главного бугорка, лингвальным цингулидом и постцингулидом. Лингвальная сторона основания коронки между дополнительными бугорками в целом прямая, слегка волнистая. Вершина главного бугорка трехгранная, его лабиальная сторона слегка выпуклая, лингвальная поверхность отчетливо вогнутая, задняя сторона прямая, постеролингвальное ребро тонкое. Постеролабиальный угол коронки выступает умеренно (на голотипе сильно стесан из-за стирания в результате окклюзии с главным бугорком P^4 , см. рис. 3г). Задний край коронки с отчетливой выемкой. Лабиальный цингулид высокий, прямой. Лингвальный цингулид в средней части слегка изогнут дорсально (рис. 2в).

M_1 примерно равен по длине M_2 . Паракристинд немного короче, а параконид лингвально выступает

слабее, чем на M_2 . Передняя сторона параконида и задняя сторона метаконида субпараллельные (вид с лингвальной стороны, см. рис. 2в). Протоконид высокий, его передний край слегка выпуклый. Вершина метаконида немного смещена дистально по отношению к вершине протоконид, протокристинд несколько скошен (рис. 3г). Лабиальный цингулид мощный, с четким бугорком на уровне вершины протоконид (рис. 2а). Тригонидный бассейн с лингвальной стороны огорожен очень низким и тонким цингулидным гребнем (рис. 3г). Дорсальный изгиб лингвального основания тригонид небольшой (рис. 2в). Талонид заметно шире тригонид, талонидный бассейн глубокий в центральной части, лингвально закрыт высоким полным энтокристиндом с глубокой узкой вырезкой. Энтоконид сравнительно низкий, существенно ниже метаконида. Гипоконулид хорошо развитый, умеренно выступающий.

M_2 отличается от M_1 сильнее сжатым продольно тригонидом и более широкой вырезкой энтокристинда. Энтоконид относительно высокий, чуть уступает по высоте метакониду (рис. 2в). Лабиальный цингулидный бугорок под протоконидом развит несколько слабее, чем на M_1 . Лингвальный цингулидный

гребень в основании тригонидного бассейна едва намечен. В остальном M_2 подобен M_1 .

M_3 намного меньше M_1 и M_2 , характеризуется узким талонидом, низкими талонидными бугорками, тонким и низким энтокротидом без вырезки. Бугорка на лабиальном цингулиде нет. Гипоконулид сильно редуцированный, слабо выступающий, но отчетливый, находится в основании задней стороны энтокротиды, соединен с постцингулидом (рис. 3б, 3в, 3е, 3ж).

На лабиальном цингулиде в основании гипокондулида каждого нижнего моляра (M_1 – M_3 на голотипе; M_3 на экз. ПИН, № 5644/653) располагается отчетливая фасетка стирания от окклюзии с параконном соответствующего верхнего моляра (рис. 2а, 2г, 3а, 3д).

Размеры в мм. Экз. ПИН, № 5644/651: M_1 : лабиальная длина – 1.4, лингвальная длина – 0.9, ширина – 1.6, ширина паракона – 0.75, ширина метакона – 0.95; ширина предглазничного мостика – 0.22.

Голотип ПИН, № 5644/652: нижнечелюстная длина (расстояние от переднего края альвеолы I_1 до заднего края мышелка, ML) – 11.4; альвеолярная длина (AL) I_1 – M_3 – 7.0; AL C_1 – M_3 – 6.15; длина P_4 – M_3 – 4.93; AL P_4 – M_3 – 4.75; длина P_4 – M_1 – 2.3; длина M_1 – M_3 – 4.15; AL M_1 – M_3 – 3.9; постдентальная длина (PL) – 4.2; лабиальная высота горизонтальной ветви (HMB) под M_1 – 1.45, под M_2 – 1.35, за M_3 – 1.5; высота в венечном отростке (расстояние от верхней точки вырезки перед угловым отростком до вершины венечного отростка с латеральной стороны, HCP) – 3.2; ширина мышелка (WC) – 1.57; длина углового отростка (расстояние от верхней точки вырезки перед угловым отростком до вершины углового отростка с латеральной стороны, APL) – 1.6; расстояние от наиболее постероventральной точки мышелка до вершины углового отростка, измеренное с латеральной стороны (CALD) – 1.85; то же расстояние, измеренное с дистальной стороны (CADD) – 2.1; размеры зубов (L – длина, W – ширина, WTR – ширина тригониды, WTAL – ширина талонида): P_4 : L – 0.85, W – 0.73; M_1 : L – 1.5, WTR – 0.9, WTAL – 1.0; M_2 : L – 1.45, WTR – 0.9, WTAL – 1.0; M_3 : L – 1.25, WTR – 0.8, WTAL – 0.6, WTAL/WTR – 0.75.

Экз. ПИН, № 5644/653: ML – 11.0; AL I_1 – M_3 – 6.8; AL C_1 – M_3 – 5.9; AL P_4 – M_3 – 4.45; AL M_1 – M_3 – 3.7; PL – 4.1; HMB под M_1 – 1.35, под M_2 – 1.35, за M_3 – 1.5; HCP – 3.3; WC – 1.57; APL – 1.7; CALD – 1.6; CADD – 1.85; M_3 : L – 1.15, WTR – 0.75, WTAL – 0.6, WTAL/WTR – 0.8.

Экз. ПИН, № 5644/654: AL I_1 – M_3 – 6.7; AL C_1 – M_3 – 6.0; AL P_4 – M_3 – 4.5; AL M_1 – M_3 – 3.8; HMB под M_1 – 1.3, под M_2 – 1.25, за M_3 – 1.3; HCP – 3.1.

Сравнение и замечания. Раннеплейстоценовая крымская форма крупнее *P. schoepfelii* Rosina

et Rummel, 2012, *P. rabederi* Wołoszyn, 1987, *P. abeli* Wettstein, 1923 и *P. crassidens* Kormos, 1930 и близка по размерам *P. atavus* Topál, 1987 и *P. pliocaenicus* Topál, 1989 (табл. 1). Среди современных видов она приблизительно соответствует по величине *P. austriacus* (Fischer, 1829), *P. sardus* Mucedda et al., 2002 и *P. macrobullaris* Kuzyakin, 1965 и заметно превосходит *P. auritus* (Linnaeus, 1758).

Plecotus atavus, *P. rabederi* и *P. crassidens* характеризуются положением подглазничного отверстия над P_4 и широким предглазничным мостиком (*P. atavus* – 0.55–0.68 мм, *P. crassidens* – 0.63 мм) [5], а *P. schoepfelii*, *P. atavus* и *P. rabederi* свойственно субмиотодонтное строение нижних моляров [7]. Значительно более дистальное положение подглазничного отверстия (над средней частью M_1) и полностью миотодонтное строение M_1 – M_3 исключают отнесение описанной крымской формы к какому-либо из указанных видов. Также она отличается от *P. schoepfelii* отсутствием лингвального смещения альвеолы P_3 , от *P. rabederi* – лабиальным смещением альвеолы I_3 и более длинным угловым отростком, а от *P. crassidens* – неслитыми корнями P_4 , хорошо развитыми антеролингвальным и постеролингвальным дополнительными бугорками P_4 , узким талонидом с отчетливым гипоконулидом M_3 и длинным угловым отростком.

Plecotus macrobullaris sarmaticus subsp. nov. демонстрирует узкий предглазничный мостик (0.22 мм), характерный для *P. pliocaenicus* (0.16–0.32 мм) и всех более поздних видов (*P. abeli* – 0.12–0.28 мм; *P. auritus* – 0.16–0.36 мм; *P. austriacus* – 0.23–0.36 мм) [5]. От *P. pliocaenicus* он отличается слабее редуцированным M_3 , а от *P. abeli* – более высоким положением подглазничного отверстия, крупным P_4 с глубокой выемкой заднего края и лучше выраженным лабиальным цингулидным бугорком M_1 – M_2 .

От *P. austriacus* отличается более дистальным положением подглазничного отверстия (у *P. austriacus* оно расположено над передней третью M_1), прямой лингвальной стороной основания коронки P_4 (у *P. austriacus* она отчетливо вогнутая) и наличием явственного гипокондулида на M_3 (у *P. austriacus* гипокондулид сильно редуцирован и при этом приподнят к верхней части задней стороны энтокротиды и обособлен от постцингулида). Различия с *P. auritus* состоят в более крупных общих размерах и в форме углового отростка (у *P. auritus* он слабо отогнут латерально и утолщен на конце).

Особенности строения углового отростка нижнечелюстной кости *P. macrobullaris sarmaticus* subsp. nov., отличающие его как от *P. auritus*, так и от *P. austriacus*, требуют специального рассмотрения. У *P. auritus* угловой отросток относительно короткий, слабо отклоняется наружу и заканчивается булавовидным утолщением; дорсальный выступ маленький или

Таблица 1. Размеры нижней челюсти и нижних зубных рядов (в мм; *n* — число экземпляров, Δ — среднее; * — по коронкам) представителей рода *Plecotus* из Европы

Таксоны	Нижнечелюстная длина			Длина C ₁ –M ₃ (альвеолы)			Длина P ₄ –M ₃			Длина M ₁ –M ₃			Длина M ₁ –M ₃ (альвеолы)		
	<i>n</i>	пределы	Δ	<i>n</i>	пределы	Δ	<i>n</i>	пределы	Δ	<i>n</i>	пределы	Δ	<i>n</i>	пределы	Δ
<i>P. macrobullaris sarmaticus</i> subsp. nov.	2	11.0–11.4	11.2	3	5.9–6.15	6.02	1	4.93	4.93	1	4.15	4.15	3	3.7–3.9	3.8
<i>P. macrobullaris alpinus</i> [1]	8	10.35–10.87	10.67	8*	5.82–6.00	5.92	—			—			—		
<i>P. macrobullaris macrobullaris</i> [1]	4	10.66–11.66	10.93	4*	5.97–6.3	6.15	—			—			—		
<i>P. sardus</i> [2]	—			1*	6.2	6.2	—			—			—		
<i>P. schoepfelii</i> [3]	—			—			—			1	3.8	3.8	—		
<i>P. atavus</i> [5]	2	10.65–11.5	11.08	2	5.84–6.07	5.96	—			—			2	3.66–3.79	3.73
<i>P. rabederi</i> [4]	14	10.38–10.9	10.69	—			13	4.31–4.73	4.53	9	3.91–4.16	4.05	—		
<i>P. crassidens</i> [5]	1	10.98	10.98	3	5.75–5.79	5.76	1	4.5	4.5	2	3.91–4.05	3.98	4	3.68–3.86	3.76
<i>P. pliocaenicus</i> [5]	—			1	6.11	6.11	1	4.68	4.68	1	3.93	3.93	1	3.77	3.77
<i>P. abeli</i> [5]	6	10.31–10.98	10.62	12	5.57–6.11	5.77	9	4.27–4.72	4.46	10	3.56–4.09	3.85	16	3.4–3.91	3.6
<i>P. auritus</i> [5]	5	10.25–10.45	10.4	5	5.44–5.89	5.61	5	4.14–4.36	4.28	5	3.56–3.77	3.66	4	3.28–3.48	3.43
<i>P. austriacus</i> [5, 8]	6	11.1–11.78	11.49	8	6.11–6.53	6.3	6	4.63–5.13	4.82	6	3.91–4.27	4.08	6	3.73–4.05	3.87

отсутствует [17, 18]. У *P. austriacus* угловой отросток более длинный, сильно отогнут латерально и оканчивается небольшим утолщением; в средней части его дорсальной стороны имеется крупный рогообразный выступ [17, 18]. У рецентных *P. macrobullaris* угловой отросток широкий, с прямым или слегка волнистым дорсальным краем, к концу не расширяется или расширяется лишь немного, а по длине соответствует таковому *P. auritus* [19]. Обычно он не имеет ни столь четко выраженного дорсального рогообразного выступа, как у *P. austriacus*, ни булавовидного утолщения на конце, как у *P. auritus*, но иногда демонстрирует варианты строения, сходные с таковым *P. austriacus* [20]. Угловой отросток у *P. macrobullaris sarmaticus* subsp. nov. имеет близкое строение, но сильнее отогнут латерально — как у *P. austriacus*.

Степень удлинения (относительную длину) углового отростка можно описать отношением длины углового отростка к нижнечелюстной длине (индекс APL/ML), а степень его латерального отклонения — отношением расстояния между наиболее постеро-вентральной точкой мыщелка и вершиной углового отростка, измеренного с дистальной стороны, к этому же расстоянию, измеренному с латеральной стороны (индекс CADD/CALD). Сравнительное изучение (см. табл. 2) показывает, что у *P. macrobullaris sarmaticus* subsp. nov., *P. macrobullaris macrobullaris* и *P. auritus* угловой отросток развит по длине примерно

одинаково (APL/ML — 14.04–16.35%), тогда как у *P. austriacus* он удлинен намного сильнее (APL/ML — 20.18%). При этом у *P. auritus* (CADD/CALD — 102.78–102.94%) и *P. macrobullaris macrobullaris* (CADD/CALD — 105.13%) угловой отросток латерально отогнут заметно слабее, чем у *P. macrobullaris sarmaticus* subsp. nov. (CADD/CALD — 113.51–115.63%) и *P. austriacus* (CADD/CALD — 112.2%).

Отмеченный на медиальной стороне углового отростка *P. macrobullaris sarmaticus* subsp. nov. рельеф в виде углубленной площадки и резкого гребня хорошо выражен у современных *P. austriacus* и *P. macrobullaris*, но более сглажен у *P. auritus* (колл. ЗМ МГУ).

Помимо формы углового отростка, раннеплейстоценовый ушан из Тавриды соответствует *P. macrobullaris* по строению P₄ (прямой лингвальный край основания коронки, развитые дополнительные бугорки, строение цингулида), M₁–M₂ (субпараллельные передняя сторона параконида и задняя сторона метаконида, соотношение высоты метаконида и энтокониды) и M₃ (узкий талонид с отчетливым гипоконулидом). При этом от рецентных подвидов *P. macrobullaris macrobullaris* и *P. macrobullaris alpinus* новая форма отличается более дистальным положением подглазничного отверстия, стабильным наличием двух подбородочных отверстий, сильнее отогнутым латерально угловым отростком и лучше развитыми бугорками лабиального цингулида M₁–M₂.

Табл. 2. Избранные размеры (мм) и индексы (%) нижнечелюстных костей (dex — правая, sin — левая) у представителей рода *Plecotus* из Европы: нижнечелюстная длина (ML), длина углового отростка (APL), расстояние между наиболее постеро-вентральной точкой мышелка и вершиной углового отростка с латеральной (CALD) и дистальной (CADD) сторон, индекс удлиннения углового отростка (APL/ML) и индекс латерального отклонения углового отростка (CADD/CALD)

Таксоны, экземпляры	ML	APL	APL/ML	CALD	CADD	CADD/CALD
<i>P. macrobullaris sarmaticus</i> subsp. nov., голотип ПИН, № 5644/652	11.4	1.6	14.04	1.85	2.1	113.51
<i>P. macrobullaris sarmaticus</i> subsp. nov., экз. ПИН, № 5644/653	11.0	1.7	15.45	1.6	1.85	115.63
<i>P. macrobullaris macrobullaris</i> , паратип ЗМ МГУ, № S-96545 (sin)	10.4	1.7	16.35	1.95	2.05	105.13
<i>P. auritus</i> , экз. ЗМ МГУ, № S-157987 (dex, sin)	10.6	1.6	15.09	1.7	1.75	102.94
<i>P. auritus</i> , экз. ЗМ МГУ, № S-174770 (dex)	10.5	1.5	14.29	1.8	1.85	102.78
<i>P. auritus</i> , экз. ЗМ МГУ, № S-167242 (dex, sin)	10.6	1.5	14.15	1.75	1.8	102.86
<i>P. austriacus</i> , экз. ЗМ МГУ, № S-74643 (sin)	11.4	2.3	20.18	2.05	2.3	112.2

Ушан из местонахождения Таврида — это первое свидетельство присутствия представителей рода *Plecotus* на территории России в раннем плейстоцене и первая ископаемая находка *P. macrobullaris*, документирующая раннюю стадию эволюционной истории этого вида. Можно предположить, что *P. macrobullaris sarmaticus* subsp. nov. был частью адаптивной радиации предковых представителей линии *P. macrobullaris* в Понто-Каспийской области.

Современный *P. macrobullaris* обитает в открытых горных областях и прилегающих к ним районах [2]; присутствие *P. macrobullaris sarmaticus* subsp. nov. в тафоценозе местонахождения Таврида согласуется с наличием открытых горных обстановок недалеко от пещеры.

Материал. Помимо голотипа (сборы 2022 г.), из пещеры Таврида (точка “Логово гиен”) три экземпляра: фрагмент правой верхнечелюстной кости с М¹ и передним лабиальным корнем М² (экз. ПИН, № 5644/651, сборы 2020 г.), левая нижнечелюстная кость с М₃ (экз. ПИН, № 5644/653, сборы 2020 г.), левая нижнечелюстная кость без зубов (экз. ПИН, № 5644/654, сборы 2018 г.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарен Д.О. Гимранову (Институт экологии растений и животных Уральского отделения РАН, Екатеринбург) и А.В. Лаврову (ПИН) за сбор материалов в пещере Таврида, Р.А. Ракитову (ПИН) — за помощь в подготовке иллюстраций, С.В. Крускопу, В.С. Лебедеву (ЗМ МГУ) и Н.В. Сердюк (ПИН) — за техническую помощь при сравнительном изучении современных образцов из коллекции ЗМ МГУ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00214, <https://rscf.ru/project/22-14-00214/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Были исследованы ископаемые материалы и рецентные экземпляры из музейной остеологической коллекции. Работы с живыми животными не проводились.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

У автора нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Spitzenberger F., Strelkov P.P., Winkler H., Haring E. A Preliminary Revision of the Genus *Plecotus* (Chiroptera, Vespertilionidae) Based on Genetic and Morphological Results // *Zoologica Scripta*. 2006. V. 35. № 3. P. 187–230.
2. Handbook of the Mammals of Europe. Chiroptera / Ed. Russo D. Cham, Switzerland: Springer, 2023. 980 p.
3. Rosina V.V., Rummel M. The Bats (Chiroptera, Mammalia) from the Early Miocene of Petersbuch (Bavaria, Southern Germany) // *Geobios*. 2012. V. 45. № 5. P. 463–478.
4. Wołoszyn B.W. Pliocene and Pleistocene Bats of Poland // *Acta Palaeontologica Polonica*. 1987. V. 32. № 3–4. P. 207–325.
5. Topál G. Tertiary and Early Quaternary Remains of *Corynorhinus* and *Plecotus* from Hungary (Mammalia, Chiroptera) // *Vertebrata Hungarica*. 1989. V. 23. P. 33–55.
6. Rabeder G. *Plecotus* und *Barbastella* (Chiroptera) im Pleistozän von Österreich // *Naturkundliches Jahrbuch der Stadt Linz*. 1974 (1973). V. 19. P. 159–184.
7. Rosina V.V., Krusko S.V., Semenov Y.A. New Late Miocene Plecotine Bats (Chiroptera, Vespertilionidae: Plecotini) from Gritsev, Ukraine // *Palaeovertebrata*. 2019. V. 42. № 1. P. 1–13. <https://doi.org/10.18563/pv.42.1.e2>

8. Horáček I., Bogdanowicz W., Đulić B. *Plecotus austriacus* (Fischer, 1829) – Graues Langohr // Handbuch der Säugetiere Europas. V. 4 (II): Fledertiere (Chiroptera) II / Eds. Niethammer J., Krapp F. Wiebelsheim: Aula-Verlag, 2004. P. 1001–1049.
9. Galán J., Núñez-Lahuerta C., Moya-Costa R., et al. Fossil Bat Assemblages as Palaeoenvironmental and Palaeoclimatic Indicators: A Case Study in the Lower to Middle Pleistocene Gran Dolina Sequence of Sierra de Atapuerca, Northern Spain // Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology. 2019. V. 535. Art. 109365. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2019.109365>
10. Juste J., Ibáñez C., Muñoz J., et al. Mitochondrial Phylogeography of the Long-eared Bats (*Plecotus*) in the Mediterranean Palaeoarctic and Atlantic Islands // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2004. V. 31. № 3. P. 1114–1126.
11. Alberdi A., Gilbert M.T.P., Razgour O., et al. Contrasting Population-level Responses to Pleistocene Climatic Oscillations in an Alpine Bat Revealed by Complete Mitochondrial Genomes and Evolutionary History Inference // Journal of Biogeography. 2015. V. 42. № 9. P. 1689–1700.
12. Лопатин А.В. Раннеплейстоценовый подковонос *Rhinolophus macrorhinus cimmerius* subsp. nov. (Rhinolophidae, Chiroptera) из пещеры Таврида в Крым // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2022. Т. 506. С. 396–405.
13. Лопатин А.В. Раннеплейстоценовый кожан *Eptesicus praeglacialis* (Vespertilionidae, Chiroptera) из пещеры Таврида в Крыму // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2023. Т. 508. С. 95–104.
14. Лопатин А.В. *Rhinolophus mehelyi scythotauricus* subsp. nov. (Rhinolophidae, Chiroptera) из нижнего плейстоцена пещеры Таврида в Крыму // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2023. Т. 509. С. 109–114.
15. Лопатин А.В. *Eptesicus nilssonii varangus* subsp. nov. (Vespertilionidae, Chiroptera) из нижнего плейстоцена пещеры Таврида в Крыму // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2023. Т. 510. С. 308–315.
16. Лопатин А.В., Вислобокова И.А., Лавров А.В. и др. Пещера Таврида – новое местонахождение раннеплейстоценовых позвоночных в Крыму // Доклады Академии наук. 2019. Т. 485. № 3. С. 381–385.
17. Ruprecht A. Metody wyróżniania *Plecotus austriacus* Fischer, 1829 i nowe stanowiska tego gatunku w Polsce // Acta Theriologica. 1965. V. 10. № 14. P. 215–220.
18. Ruprecht A.L. Taxonomic Value of Mandible Measurements in the Genus *Plecotus* Geoffroy, 1818 // Acta Theriologica. 1969. V. 14. № 6. P. 63–68.
19. Spitzenberger F., Haring E., Tvrtković N. *Plecotus microdonatus* (Mammalia, Vespertilionidae), a New Bat Species from Austria // Natura Croatica. 2002. V. 11. № 1. P. 1–18.
20. Galán J., Núñez-Lahuerta C., Bartolomé M. The Tale of an Ice-preserved Alpine Long-eared Bat in the Pyrenees // Journal of Bat Research and Conservation. 2022. V. 15. № 1. P. 69–71.

PLECOTUS MACROBULLARIS SARMATICUS SUBSP. NOV. (VESPERTILIONIDAE, CHIROPTERA) FROM THE EARLY PLEISTOCENE OF CRIMEA

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

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

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

The extinct mountain long-eared bat *Plecotus macrobullaris sarmaticus* subsp. nov. is described on the base of jaw remains from the Lower Pleistocene of the Taurida cave in central Crimea. This is the first record of the genus *Plecotus* in the Lower Pleistocene of Russia and the first fossil find of *P. macrobullaris* Kuzyakin, 1965, documenting the early stage of the evolutionary history of the species.

Keywords: *Plecotus macrobullaris*, mountain long-eared bat, chiropterans, Early Pleistocene, Crimea

УДК [576.314:591.111.2]:612.111–597.556.31

МЕМБРАНОСВЯЗАННАЯ ФЕРРИ-ФОРМА ГЕМОГЛОБИНА В ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТАХ МОРСКОГО ЕРША (*SCORPAENA PORCUS*, LINNAEUS, 1758)

© 2024 г. А. А. Солдатов^{1,2,*}, Н. Е. Шалагина¹, В. Н. Рычкова¹, Т. А. Кухарева¹

Представлено академиком РАН Н.Н. Немовой

Поступило 15.02.2024 г.

После доработки 10.03.2024 г.

Принято к публикации 14.03.2024 г.

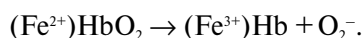
В условиях *in vitro* исследовали содержание мембраносвязанной фракции метгемоглобина (MtHb) в ядерных эритроцитах морского ерша (*Scorpaena porcus*, Linnaeus, 1758). Изучали спектральные характеристики цельного гемолизата, гемолизата после осаждения стромы (очищенный гемолизат) и ресуспензированной стромы. Установлено, что доля MtHb в строме эритроцитов превышала 80% (6.20 ± 0.59 мкМ). Очищенные гемолизаты практически не содержали MtHb (0.5 ± 0.2 мкМ). Присутствие мембраносвязанной ферри-формы не влияло на устойчивость эритроцитов к осмотическому шоку. Пределы осмотической стойкости ($102\text{--}136$ мОсм кг^{-1}), определенные при помощи лазерного анализатора микрочастиц LaSca-TM (BioMedSystems, Россия), совпадали с отмеченными для других видов костистых рыб. Нитритная нагрузка (10 мг л^{-1}) вызывала значительный рост содержания MtHb в крови. Однако уровень мембраносвязанной ферри-формы при этом существенно не изменялся и составлял 6.34 ± 1.09 мкМ (около 95%). Это свидетельствует о функциональной целесообразности ее присутствия в данной структуре. Наличие MtHb в цитоплазматической мембране ядерных эритроцитов, по-видимому, позволяет клеткам нейтрализовать внешнюю окислительную нагрузку и токсическое действие сероводорода в придонных слоях воды, в которых обитает морской ерш.

Ключевые слова: клеточная мембрана, эритроциты, метгемоглобин, осмотический шок, нитриты, морской ерш

DOI: 10.31857/S2686738924030065, EDN: VUBDLE

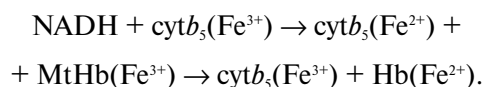
ВВЕДЕНИЕ

В сравнении с высшими позвоночными гемоглобины рыб отличаются низкой устойчивостью к окислению [1]. В процессе деоксигенации часть пигмента может переходить в ферри-состояние, сопровождающееся окислением железа гема:



Данное соединение неспособно связывать кислород и получило название метгемоглобина (MtHb). Ядерные эритроциты рыб располагают весьма эффективным молекулярным комплексом, действие которого направлено на поддержание гемоглобина в восстановленном состоянии. К нему следует от-

нести NADH₂-зависимую MtHb-редуктазу, которая переносит электрон с NADH на цитохром *b*₅, а затем на MtHb:



Сравнительная оценка показала, что у рыб этот процесс протекает более эффективно, чем у высших позвоночных [2]. В подавлении процессов самоокисления гемоглобина принимает участие и антиоксидантный ферментный комплекс. Активность ряда ферментов (пероксидазы, супероксиддисмутазы) и концентрация восстановителей (GSH) у рыб превышает таковую у человека [3]. Вместе с тем, устойчивость гемоглобинов рыб к окислению оказывается существенно ниже. Уровень MtHb в крови в норме может превышать 10% [4]. Причина этого до конца не понятна.

Окисленные формы гемоглобина легко встраиваются в мембранные структуры эритроцита [5, 6].

¹ФИЦ “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского Российской академии наук”, Севастополь, Россия

²Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия

*e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Считается, что в незначительных количествах они способствуют стабилизации клеточного цитоскелета [5]. Осмотические характеристики и процессы перекисного окисления липидов мембранных структур клетки при этом сохраняются в пределах функциональной нормы [6]. Связанный гемоглобин находится в комплексе, содержащем спектрин, анкирин и полосу 4.2, которые являются общими для одного из узлов цитоскелета. При этом он проявляет окислительно-восстановительную активность и способен связываться с лигандами [5]. Доля мембраносвязанного гемоглобина может находиться в пределах 0.5–12%, что сопоставимо с относительным содержанием MtHb в крови большинства костистых рыб. Это позволяет предположить наличие ассоциации MtHb с мембранными структурами эритроцита у рыб. Проверке данного предположения и посвящена настоящая работа.

Цель исследования — определить долю мембраносвязанного метгемоглобина в эритроцитах морского ерша в норме и условиях окислительных нагрузок (эксперименты *in vitro*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали взрослых особей морского ерша (*Scorpaena porcus*, Linnaeus, 1758) обоих полов (длина тела 12–14 см, вес 90–114 г) в состоянии относительного функционального покоя (стадия зрелости гонад II–III). Рыбу перевозили в аквариальную в пластиковых баках емкостью 60 л с воздушной аэрацией. После транспортировки животных рассаживали в аквариумы, имеющие естественный проток и освещение, и выдерживали в данных условиях в течение 5–7 суток. В работе использовали подвижных, активно питающихся особей. Контроль за температурой и концентрацией кислорода в воде осуществляли при помощи кислородомера ST300D RU (“Ohaus”, США). Перед отбором проб крови, чтобы исключить развитие состояния манипуляционного стресса, в воде аквариума в качестве анестетика растворяли уретан. Эффективные концентрации его для морского ерша были определены ранее [7].

Отбор проб и пробоподготовка

Кровь получали пункцией хвостовой артерии. В качестве антикоагулянта применяли гепарин (Рихтер, Венгрия). Плазму отделяли путем центрифугирования: рефрижераторная центрифуга Eppendorf Centrifuge 5424 R при 845 g. Эритроцитарную массу трижды отмывали от плазмы в среде: 128 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1.5 mM MgCl₂, 15 mM трис, 2.2 mM D-глюкозы (pH 7.8) [8] при 845 g в течение 5 мин. Ее использовали при проведении экспериментов *in vitro*.

Экспериментальные схемы

Работа была выполнена в 2 этапа. В начале (опыт 1) часть отмытой эритроцитарной массы (1/2 объема) лизировали при помощи фосфатного буфера (0.02 mM, pH 7.3), прописывали спектры для цельного гемолизата. Стромой осаждали при 9400 g в течение 2 минут (очищенный гемолизат). Для надосадочной жидкости повторно прописывали спектры. Стромой трижды отмывали в фосфатном буфере, ресуспендировали и прописывали спектры.

Часть (1/2 объема) полученной ранее эритроцитарной массы преинкубировали в среде [8], содержащей 10 мг л⁻¹ нитрита натрия, в течение 30 минут (опыт 2). Затем клетки осаждали и лизировали при помощи фосфатного буфера (0.02 mM, pH 7.3). Прописывали спектры для цельного и очищенного гемолизата, а также для ресуспендированной стромы, как описано выше.

Спектральный анализ растворов и взвесей

Спектры с полученных гемолизатов и взвесей стромы снимали при помощи двухлучевого спектрофотометра СПЕКС ССП-715 (ЗАО “Спектроскопические системы”, Россия). Расчет относительного содержания охуHb (HbO₂), деохуHb (Hb) и MtHb проводили по уравнениям [9], рассчитанным для pH 7.3:

$$[\text{HbO}_2] = (1.013 A_{576} - 0.3269 A_{630} - 0.7353 A_{560}) \times 10^{-4}$$

$$[\text{Hb}] = (1.373 A_{560} - 0.747 A_{576} - 0.737 A_{630}) \times 10^{-4}$$

$$[\text{MtHb}] = (2.985 A_{630} + 0.194 A_{576} - 0.4023 A_{560}) \times 10^{-4}$$

Осмотическая стойкость эритроцитов

Осмотическую резистентность клеток красной крови оценивали при помощи метода лазерной дифракции. Для количественного описания осмотической хрупкости эритроцитов морского ерша использовались точки 10% (H₁₀), 50% (H₅₀) и 90% гемолиза (H₉₀), отражающие осмолярность среды, при которой наблюдается лизис 10%, 50% и 90% клеток в образце. В работе использовали лазерный анализатор микрочастиц LaSca-TM (BioMedSystems, Россия). В обработке полученной информации было задействовано оригинальное программное обеспечение LaSca_32 v.1498. Величина осмолярности растворов контролировалась при помощи криоосмометра OsmoSpecial 1 (Италия).

Статистический анализ

При проведении сравнительного анализа применен однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) PAST Version 4.09 software. Статистические сравнения проводились на основе непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Графически

цифровой материал обработан с использованием стандартного пакета Grapher (версия 11). Результаты представлены как $M \pm m$. Минимальный уровень значимости составлял $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Образцы спектров представлены на рис. 1. У цельных и очищенных гемолізатов они были подобны (рис. 1а, 1б). Отличие состояло лишь в том, что значения экстинкции при 630 нм у первых были несколько выше. Расчеты показали, что содержание MtHb у цельных гемолізатов находилось на уровне 8.23 ± 0.65 мкМ (рис. 2). Центрифугирование образцов при 9400 g снижало эту величину почти в 15 раз ($p < 0.001$).

Уровень MtHb в очищенных гемолізатах составлял 0.5 ± 0.2 мкМ. Спектральный анализ ресуспензированной стромы эритроцитов показал, что она более чем на 80% (6.20 ± 0.59 мкМ) была представлена ферри-формой (рис. 1в, 2). Уровень охуHb и деохиHb был невелик: 1.09 ± 0.08 и 0.16 ± 0.04 мкМ соответственно.

Преинкубирование эритроцитарной взвеси в среде [8], содержащей 10 мг л^{-1} нитрита натрия, значительно увеличивало долю ферри-формы. В спектрах явно повышалась величина экстинкции при 630 нм (рис. 1а, 1б). Содержание MtHb в цельных и очищенных гемолізатах находилось на уровне 45.9 ± 5.09 и 35.9 ± 1.5 мкМ соответственно (рис. 3). Разница составляла около 22% ($p < 0.01$). Анализ спектральных характеристик ресуспензированной стромы показал, что она почти на 95% (6.34 ± 1.09 мкМ) была представ-

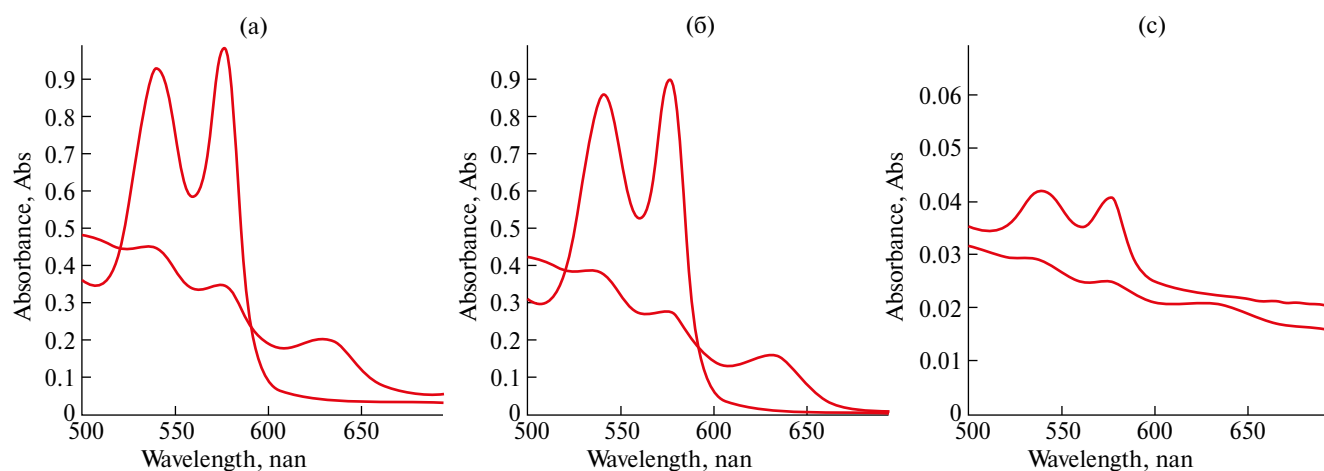


Рис. 1. Образцы спектров цельных гемолізатов (а), гемолізатов без стромы (б) и ресуспензированной стромы (в) (1 – без нитрита, 2 – с нитритом).

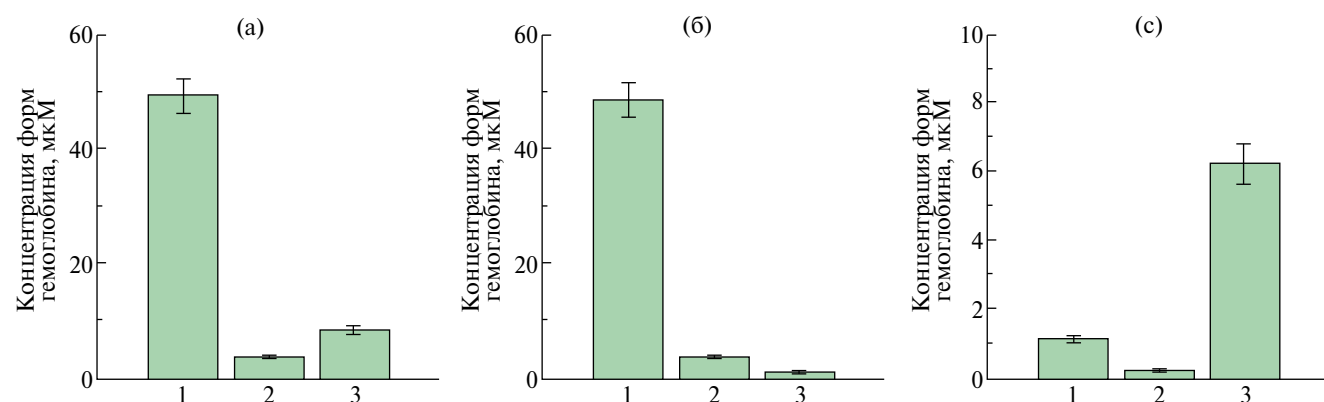


Рис. 2. Концентрация отдельных форм гемоглобина в цельных гемолізатах (а), гемолізатах без стромы (б) и ресуспензированной стромы (в) (1 – охуHb, 2 – деохиHb, 3 – MtHb).

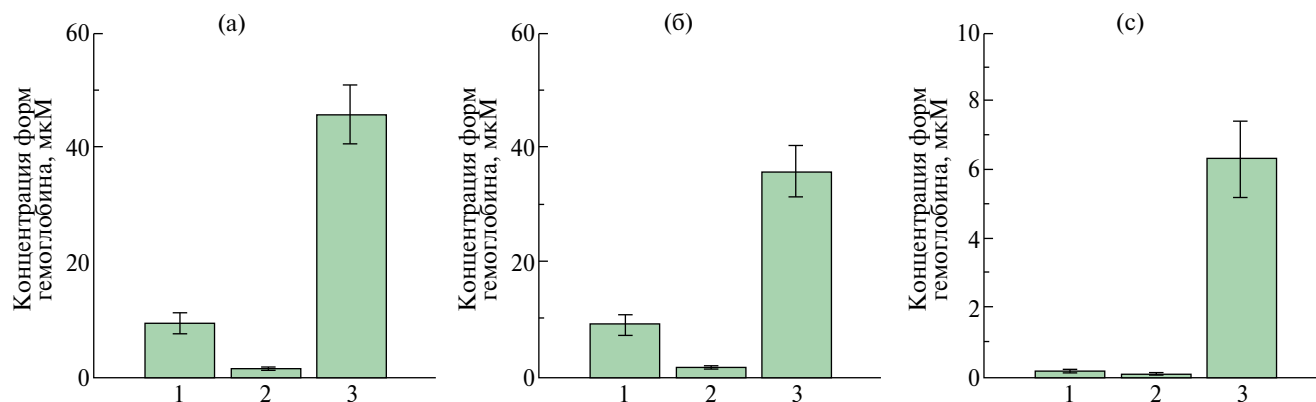


Рис. 3. Концентрация отдельных форм гемоглобина в цельных гемолизатах (а), гемолизатах без стромы (В) и ресуспензированной стромы (в) в условиях нитритной нагрузки (1 – охуНб, 2 – деохуНб, 3 – МтНб).

лена ферри-формой (рис. 1в, 2). Суммарная фракция охуНб и деохуНб не превышала 6% ($0.30 \pm 0.07 \text{ мкМ}$). Как видно, доля мембраносвязанной ферри-формы гемоглобина осталась практически без изменений: $6.20 \pm 0.59 \text{ мкМ}$ (без нитрита) и $6.34 \pm 1.09 \text{ мкМ}$ (с нитритом) ($p > 0.05$).

Присутствие в мембране эритроцитов МтНб допускает их низкую стойкость к осмотическому шоку. Использование метода лазерной дифракции позволило определить границы толерантности клеток красной крови морского ерша к данному фактору (рис. 4). Начало лизиса (H_{10}) отмечали при $135.5 \pm .4 \text{ мОсм кг}^{-1}$. Основная масса клеток (H_{50}) разрушалась при $117.7 \pm 3.9 \text{ мОсм кг}^{-1}$. Завершение лизиса (H_{90}) происходило при $102.4 \pm 4.1 \text{ мОсм кг}^{-1}$. Эти результаты соответствуют диапазону толерантности эритроцитов к осмотическому шоку большинства костистых рыб.

Мембраносвязанным формам гемоглобина посвящено сравнительно большое число работ, выполненных в основном на высших позвоночных, – [10–12] и др. Приоритет отдается деохуНб. Отмечается его способность к взаимодействию с анионтранспортным белком полосы 3 (СДВ3), а также спектрином и гликофоринном [11]. В основе взаимодействия могут лежать гидрофобные, дисульфидные, электростатические связи [13]. Они могут быть временными и необратимыми [13]. Необратимое взаимодействие характеризуется образованием ковалентных связей, что свойственно в основном окисленным формам гемоглобина (феррил- и оксоферрилгемоглобин, гемихромы, МтНб) [14]. Они индуцируют свободнорадикальное окисление, что сказывается на функциональных характеристиках клеток красной крови: снижение осмотической стойкости [12]. В нашем случае в ресуспензированной строме эритроцитов явно преобладала фракция МтНб. Однако это не вли-

яло на устойчивость эритроцитов к осмотическому шоку. Диапазон лизиса совпадал с нормальными величинами, показанными для других видов костистых рыб [6]. Это позволяет предположить наличие функциональной целесообразности присутствия ферри-формы гемоглобина в цитоплазматических мембранах клеток красной крови.

О функциональной значимости взаимодействия гемоглобина с мембраной эритроцита однозначного мнения нет. Допускается, что оно направлено на стабилизацию липидного бислоя [5]. Определенное значение это может иметь при адаптации к условиям гипоксии. Взаимодействие деохуНб с СДВ3 высвобождает ферменты гликолиза с сайта связывания с СДВ3 и переводит их в активное состояние. В клетке усиливаются анаэробные процессы [10].

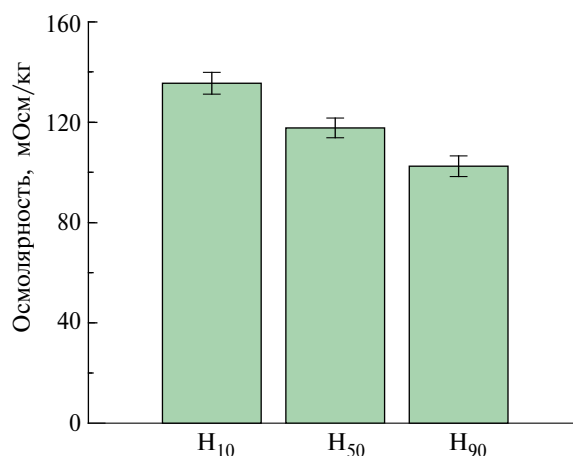


Рис. 4. Осмотическая резистентность циркулирующей эритроцитарной массы у морского ерша (H_{10} – лизис 10% клеток, H_{50} – лизис 50% клеток, H_{90} – лизис 90% клеток).

Показана также способность мембраносвязанного гемоглобина к восстановлению нитрит-ионов и генерации NO, который участвует в регуляции тонуса гладкомышечной стенки сосудов [15]. Эти результаты, однако, не следует экстраполировать на материалы, представленные в настоящей работе, так как речь идет о мембраносвязанном MtHb.

Известно, что эритроциты рыб вступают в прямое взаимодействие с факторами водной среды на уровне респираторных поверхностей. Придонные слои воды, в которых обитает морской ерш, обладают определенной токсичностью. Здесь активно протекают окислительные процессы, возможно локальное образование сероводорода. В этой связи способность клеток красной крови к нейтрализации подобной нагрузки приобретает особое значение. Присутствие в мембране MtHb позволяет перехватывать электроны и нейтрализовать тем самым действие окислителей. Следует принять во внимание, что в отличие от безъядерных эритроцитов высших позвоночных NADH-MtHb-редуктаза у них локализуется именно в цитоплазматической мембране [16]. Такая локализация делает эту систему восстановления MtHb недоступной для действия высокоэффективного антиоксидантного ферментного комплекса ядерного эритроцита [3], что позволяет поддерживать относительно высокий уровень MtHb в клетке.

Особо следует остановиться на токсическом действии сероводорода (H_2S), который может присутствовать в придонных слоях воды. Данное соединение ингибирует активность цитохром-с-оксидазы дыхательной цепи митохондрий [17], переводит гемосодержащие белки в сульф-форму [18], подавляет экспрессию транскрипционного фактора, индуцируемого гипоксией (hypoxic inducible factor, HIF) [19]. Без нейтрализации H_2S существование организмов в данных условиях оказывается невозможным. Недавно в экспериментах *in vitro* показана способность MtHb связывать H_2S , что не позволяет ему проникать в клетку [20]. Можно предположить, что эта функция для мембраносвязанного MtHb может быть одной из ведущих.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках проекта РНФ № 23-24-00061.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с использованием рыбы были выполнены в соответствии с Директивой Совета Европейских сообществ (2010/63/EU) и одобрены комиссией по биэтике ФИЦ ИнБЮМ по уходу и использованию животных (протокол № 4/23 от 26.10.2023).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Maestre R., Pazos M., Medina I.* Involvement of Methemoglobin (MetHb) Formation and Hemin Loss in the Pro-oxidant Activity of Fish Hemoglobins // *J. Agric. Food Chem.* 2009. V. 57. № 15. P. 7013–7021.
2. *Jensen F.B., Nielsen K.* Methemoglobin Reductase Activity in Intact Fish Red Blood Cells // *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. & Integ. Physiol.* 2018. V. 216. P. 14–19.
3. *Woo S.P.S., Liu W., Au D.W.T., et al.* Antioxidant Responses and Lipid Peroxidation in Gills and Erythrocytes of Fish (*Rhabdosargus Sarba*) upon Exposure to *Chattonella Marina* and Hydrogen Peroxide: Implications on the Cause of Fish Kills // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2006. V. 336. P. 230–241.
4. *Hardig J., Hoglund L. B.* Seasonal and Ontogenetic Effects on Methaemoglobin and Reduced Glutathione Contents in the Blood of Reared Baltic Salmon // *Comp. Biochem. Physiol.* 1983. V. 76A. № 1. P. 27–34.
5. *Welbourn E.M., Wilson M.T., Yusof A., et al.* The Mechanism of Formation, Structure and Physiological Relevance of Covalent Hemoglobin Attachment to the Erythrocyte Membrane // *Free Rad. Biol. Med.* 2017. V. 103. P. 95–106.
6. *Sztiller M., Puchala M., Kowalczyk A., et al.* The Influence of Ferrylhemoglobin and Methemoglobin on the Human Erythrocyte Membrane // *Red. Rep.* 2006. V. 11. № 6. P. 263–271.
7. *Soldatov A.A.* Physiological Aspects of Effects of Urethane Anesthesia on the Organism of Marine Fishes // *Hydrobiol. J.* 2005. V. 41. № 1. P. 113–126.
8. *Tiihonen K., Nikinmaa M.* Short Communication Substrate Utilization by Carp (*Cyprinus Carpio*) Erythrocytes // *J. Exp. Biol.* 1991. V. 161. № 1. P. 509–514.
9. *Benesch R.E., Benesch R., Yung S.* Equations for the Spectrophotometric Analysis of Hemoglobin Mixtures // *Anal. Biochem.* 1973. V. 55. P. 245–248.
10. *Chu H., Breite A., Ciralo P., et al.* Characterization of the Deoxyhemoglobin Binding Site on Human Erythrocyte Band 3: Implications for O_2 Regulation of Erythrocyte Properties // *Blood.* 2008. V. 111. P. 932–938.
11. *Sega M.F., Chu H., Christian J., et al.* Interaction of Deoxyhemoglobin with the Cytoplasmic Domain of Murine Erythrocyte Band 3 // *Biochem.* 2012. V. 51. P. 3264–3272.
12. *Rifkind J.M., Nagababu E.* Hemoglobin Redox Reactions and Red Blood Cell Aging // *Antioxidants & Redox Signaling.* 2013. V. 18. P. 2274–2283.
13. *Demehin A.A., Abugo O.O., Jayakumar J.R., et al.* Binding of Hemoglobin to Red Cell Membranes with Eosin-5-Maleimide-Labeled Band 3: Analysis of Centrifugation and Fluorescence Data // *Biochem.* 2002. V. 41. P. 8630–8637.
14. *Nagababu E., Mohanty J.G., Bhamidipaty S., et al.* Role of Membrane in the Formation of Heme Degradation Products in Red Blood Cells // *Life Sci.* 2010. V. 86. P. 133–138.
15. *Salhany J.M.* Kinetics of Reaction of Nitrite with Deoxy Hemoglobin after Rapid Deoxygenation or Predeoxygenation by Dithionite Measured in Solution and Bound to the Cytoplasmic Domain of Band 3 (SLC4A1) // *Biochemistry.* 2008. V. 47. P. 6059–6072.
16. *Saleh M.C., McConkey S.* NADH-dependent Cytochrome b5 Reductase and NADPH Methemoglobin Reductase Activity in the Erythrocytes of *Oncorhynchus Mykiss* // *Fish Physiol. Biochem.* 2012. V. 38. P. 1807–1813.

17. Cooper C.E., Brown G.C. The Inhibition of Mitochondrial Cytochrome Oxidase by the Gases Carbon Monoxide, Nitric Oxide, Hydrogen Cyanide and Hydrogen Sulfide: Chemical Mechanism and Physiological Significance // J. Bioenerg. Biomembr. 2008. V. 40. P. 533–539.
18. Bagarinao T. Sulfide as an Environmental Factor and Toxicant: Tolerance and Adaptations in Aquatic Organisms // Aquat. Toxicol. 1992. V. 24. P. 21–62.
19. Wu B., Teng H., Yang G. Hydrogen Sulfide Inhibits the Translational Expression of Hypoxia-inducible Factor-1 α // Br. J. Pharmacol. 2012. V. 167. P. 1492–1505.
20. Jensen B., Fago A. A Novel Possible Role for Met Hemoglobin as Carrier of Hydrogen Sulfide in the Blood // Antioxidants & Redox Signaling. 2020. V. 32. № 4. P. 258–265.

MEMBRANE-BOUND FERRIFORM HEMOGLOBIN IN NUCLEAR ERYTHROCYTES OF THE SEA RUFF (*SCORPAENA PORCUS*, LINNAEUS, 1758)

A. A. Soldatov^{a,b,#}, N. E. Shalagina^a, V. N. Rychkova^a, T. A. Kukhareva^a

^aA. O. Kovalevsky Institute of Biology of the South Seas of the Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russian Federation

^bSevastopol State University, Sevastopol, Russian Federation

[#]e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Presented by Academician of the RAS N.N. Nemova

The content of the membrane-bound methemoglobin fraction (MtHb) in the nuclear erythrocytes of the sea ruff (*Scorpaena porcus*, Linnaeus, 1758) was studied *in vitro*. The spectral characteristics of whole hemolysate, hemolysate after stroma deposition (purified hemolysate), and resuspended stroma were studied. It was found that the proportion of MtHb in the stroma of erythrocytes exceeded 80% ($6.20 \pm 0.59 \mu\text{M}$). The purified hemolysates practically did not contain MtHb ($0.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$). The presence of a membrane-bound ferriform did not affect the resistance of erythrocytes to osmotic shock. The osmotic resistance limits determined using the LaSca-TM microparticle laser analyzer (BioMedSystems, Russia) ($102\text{--}136 \text{ mOsm kg}^{-1}$) coincided with those noted for other bony fish species. The nitrite load (10 mg l^{-1}) caused a significant increase in the MtHb content in the blood. However, the level of the membrane-bound ferriform did not change significantly and amounted to $6.34 \pm 1.09 \mu\text{M}$ (about 95%). This indicates the functional expediency of its presence in this structure. The presence of MtHb in the cytoplasmic membrane of nuclear erythrocytes, apparently, allows cells to neutralize the external oxidative load and the toxic effect of hydrogen sulfide in the bottom layers of water in which the sea ruff lives.

Keywords: cell membrane, erythrocytes, methemoglobin, osmotic shock, nitrites, sea ruff

УДК 578.832.1;579.22

ДВЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОГОРТЫ ГЛАВНОГО НУКЛЕОКАПСИДНОГО БЕЛКА NP И ИХ СВЯЗЬ С КРУГОМ ХОЗЯЕВ У ВИРУСОВ ГРИППА А

© 2024 г. А. И. Чернышова¹, член-корреспондент РАН О. П. Жирнов^{1,2,*}

Поступило 10.12.2023 г.

После доработки 24.01.2024 г.

Принято к публикации 28.01.2024 г.

Вирус гриппа А имеет широкий природный ареал среди птиц, млекопитающих и людей. Одним из главных регуляторных адаптеров круга хозяев вируса выступает белок вирусного нуклеокапсида (NP). Посредством филогенетического анализа белка NP различных вирусов обнаружено существование двух филогенетических когорт у вирусов гриппа человека. Когорта I объединяет классические вирусы человека, вызвавшие эпидемии в 1957, 1968, 1977 гг. Когорта II ассоциирована с вирусом человека H1N1/2009pdm, имеющим смешанное птичье-свиное происхождение, который вызвал глобальную пандемию у людей в 2009 г. Возникший в 2021 г. вирус высоко вирулентного птичьего гриппа H5N1 обладает белком NP филогенетической когорты II и, следовательно, по типу адаптации к человеку близок вирусу H1N1/2009pdm и имеет высокий эпидемический потенциал для людей. Полученные данные раскрывают механизмы и динамику адаптации вирусов гриппа птиц к человеку и создают основу для системного мониторинга опасных штаммов вируса с целью выявления предвестников эпидемии и принятия своевременных предупредительных мер.

Ключевые слова: вирус гриппа, круг хозяев, белок NP, вирус H5N1

DOI: 10.31857/S2686738924030071, **EDN:** VTWTOF

Род *Alphainfluenzavirus* (вирус гриппа А по прежней классификации) относится к оболочечным вирусам, имеющим в качестве генома 8 сегментов РНК негативной или двойной (амбисенс) полярности [1, 2]. Сегмент РНК № 5 кодирует главный нуклеокапсидный белок NP (мол. масса 70 кДа; 498 а. к.), формирующий с геномной РНК и тремя субъединицами полимеразы PB1, PB2 и PA сегменты вирусного рибонуклеопротеида (РНП). На матрице РНК в составе РНП вирусные полимеразы осуществляют транскрипцию и репликацию вирусного генома. NP является мажорным структурным белком и присутствует в количестве около 1000 молекул на вирион. Помимо структурной роли в формировании вирионов и метаболической функции в транскрипции генома, NP участвует в регуляции круга хозяев вируса

[3, 4]. Вирусы гриппа А имеют широкий круг хозяев, состоящий из птиц, млекопитающих животных и человека. Птицы являются главным природным резервуаром вируса гриппа А, в котором зарождаются новые разновидности потенциально вирулентного для человека вируса, дающего начало эпидемиям и пандемиям. При этом от птиц вирусы гриппа переходят на человека, как правило, через промежуточного хозяина, роль которого чаще других могут выполнять свиньи, и возможно тюлени, норки, кошки, лисы, собаки и другие млекопитающие, а роль вирусных переносчиков в природе могут выполнять перелетные птицы, утки, чайки, гуси и др., связанные с животными цепочкой хищник–жертва [5–7].

Важную роль в переходе вируса гриппа от птиц к человеку выполняет белок NP. Эта регуляторная роль определяется тем фактом, что белок NP взаимодействует с рядом клеточных факторов, которые имеют видовую специфичность, характерную для определенного вида животного или птиц. К числу таких факторов относится фактор видового иммунитета Mx [8], ядерные регуляторы ANP32A/B, участвующие во внутриядерном процессе ацетилирования гистонов и цитоплазматического транспорта экспортированных вирусных мРНК [9], альфа-импортин, регулирующий транспорт вирусного РНП через ядерную пору

¹Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, Научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

²Русско-немецкая академия медико-социальных и биотехнологических наук, Инновационный центр Сколково, Москва, Россия

*e-mail: zhirnov@inbox.ru

в инфицированной клетке [10], клеточный фактор UAP56 сплайсинга синтезируемых в клеточном ядре РНК [11] и др. Вполне логично предположить, что взаимодействие с указанными факторами должно иметь структурно-функциональные особенности и отличия у белков NP вирусов, адаптированных к птицам или к человеку. На основании этого предположения нами ставился вопрос — будут ли NP белки вирусов птиц и человека иметь различия на этапах своей эволюции и будут ли эти специфические различия сохраняться у вирусов-мигрантов, перешедших от птиц (или млекопитающих животных) к человеку.

В поисках филогенетических связей между белками NP у вирусов гриппа А различного происхождения исследовали первичные структуры нуклеокапсидных белков NP вирусов гриппа А, изолированных в последние ~100 лет от различных видов хозяев. Филогенетические сравнения проводили с помощью программы MEGA-10 на основании вирусных последовательностей из баз данных GISAID и GenBank. Как видно на рис. 1, были идентифицированы две основные филогенетические когорты у белка NP вирусов, эволюционное расхождение которых было ассоциировано с видом хозяина вируса. Филогенетическая когорта I ассоциирована с классическими вирусами сезонного гриппа человека, вызвавшими эпидемии среди людей в 1957, 1968 и 1977 годах. Вторая филогенетическая когорта II ассоциирована с вирусами гриппа различных субтипов, изолированных от птиц и свиней, включая циркулирующие в популяциях животных типичные для пандемических вирусов человека субтипы H1, H2, H3. Таким образом, этот результат показывает существование в природном ареале двух больших когорт нуклеокапсидного белка NP “человеческого” и “птичьего” типов.

Второе важное наблюдение касается наличия филогенетических связей у клайда пандемического вируса человека H1N1/2009pdm в рамках когорты II. Такой клайд в эволюции гена NP у вирусов гриппа А человека сформировался недавно, около 2009 года, что было связано с появлением вируса H1N1/2009pdm (рис. 1; показан стрелкой). Этот вирус возник в популяции свиней в результате смешивания генов вирусов свиней, птиц и человека, и затем возникший реассортант перешел на человека и вызвал планетарную пандемию гриппа среди людей в 2009 и последующие годы [6, 12]. Оказалось, что белок NP данного вируса человека находится в когорте II “птичьего/свиного” происхождения, из чего следует, что по своей филогенетической позиции был ближе к вирусам птиц, чем к таковой у классических вирусов гриппа А человека. Следовательно, можно предположить, что данный субтип пандемического вируса с белком NP птичьего прототипа приобрел частичную адаптацию к человеку и закрепился в популяции людей, но при этом сохранял близость прототипным

вирусам птиц. Из этого наблюдения вытекает важный вывод о том, что преодоление вирусами межвидового барьера птицы—человек возможно не только посредством шифта (приобретения гена адаптированного белка NP посредством реассортации РНК сегментов между вирусами от различных хозяев), но и посредством приспособления (адаптации) вирусного белка NP при переходе вируса к новому хозяину.

Белок NP, играющий роль регуляторного адаптера между вирусом и хозяином, для выполнения этой функции имеет определенные аминокислотные паттерны, так называемые генетические штампы (“genetic signatures”) [3, 4]. Наиболее важными для размножения в организме человека у белка NP классических вирусов гриппа А человека служат 15 специфических позиций аминокислот (генетический штамп) (рис. 2) [13, 14]. Генетический штамп белка NP вируса H1N1/2009pdm человека имел меньшее сходство с таковым у вируса гриппа классического (сезонного) гриппа человека (20% гомологичных а. к. позиций, выделены белым фоном), чем с NP вируса гриппа птиц (67% гомологичных а. к. позиций, выделены серым фоном) (рис. 2), что согласуется с данными филогенетического анализа (рис. 1). Представляется возможным, что на предэпидемическом этапе в период 2000—2009 гг. при эпидемии H1N1/2009pdm в организме свиней в результате реассортации вирусных геномов возник уникальный вирус с тандемом гена NP классического свиного (исходно птичьего) вируса и гена PB2 вируса классического гриппа человека [12].

Адаптация данного тандема к млекопитающим происходила главным образом за счет гена преадаптированного PB2 “человеческого” вируса с минимальными изменениями в “птичьем” гене NP, сохранившим существенную часть (~67%) исходных аминокислотных позиций, характерных для птичьих штампов (см. рис. 2; позиции выделены серым фоном) и одну отличительную уникальную замену в позиции 313, которая, как известно, играет важную роль в подавлении клеточной митофагии белком NP при инфекции клеток (рис. 2, выделена заштрихованным фоном) [15]. В результате, в отличие от когорты I классических вирусов человека, сложилась новая эволюционная ветвь вирусов пандемического гриппа А/H1N1/2009pdm человека (клайд H1N1/2009pdm на рис. 1), в которой белок NP оказался структурно близким к свиным вирусам гриппа А, но исходно происходящим от птиц [6, 12].

На современном этапе 2021—2023 годов на всех континентах наблюдается резкий подъём заболеваемости птиц в природе и с/х популяциях высоко патогенным вирусом субтипа H5N1, вызывающим высокую популяционную летальность более 50% [16, 17]. Опасным и угрожающим для людей следствием этого роста заболеваемости птичьего вируса H5N1 служит

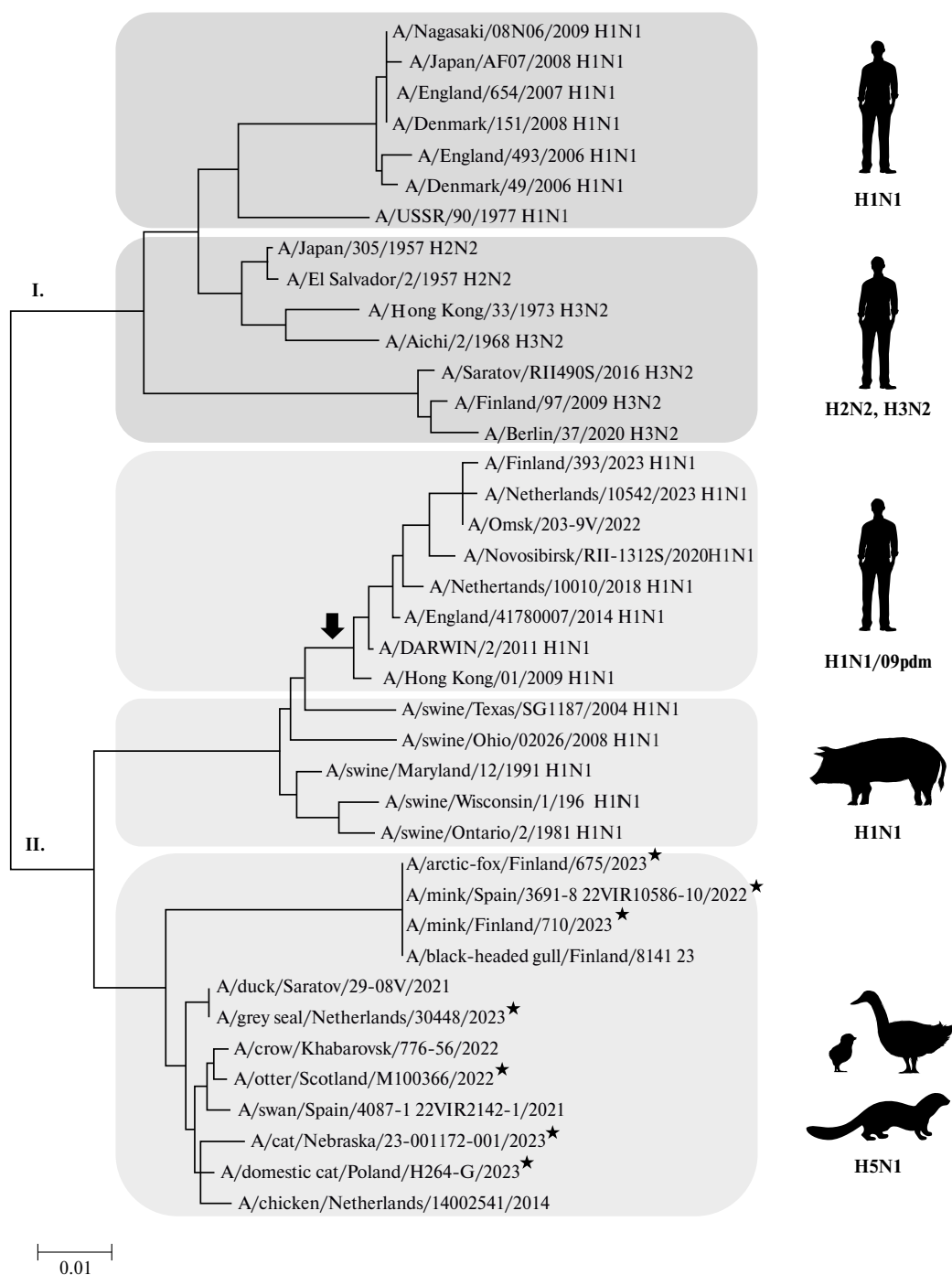


Рис. 1. Филогенетический анализ первичной структуры белка NP вирусов гриппа А птиц и млекопитающих животных, включая человека. Филогенетическое дерево белка NP построено по последовательностям белка NP из базы данных GISAID и GenBank. Исследованы вирусы гриппа А, изолированные от птиц, свиней, норок, кошек и других млекопитающих животных, включая человека, в период 1957–2023 гг. Для анализа применяли программу MEGA-10 (алгоритм ближайшего соседа – NJ). Для построения дерева использованы 39 полных последовательностей а.к. белков NP для вирусов классического гриппа человека H1N1 (1950–2008 гг.), классической линии свиных штаммов H1N1 (1961–2020 гг.), птичьих вирусов субтипа H5N1 (2014–2023 гг.), вирусов H5N1 от млекопитающих (2021–2023 гг.). GenBank: AAA51491.1; AFM72964.1; ABD60794.1; AFM71861.1; ABW36337.1; ACD85158.1; ADM18085.1; ANB51548.1; ADG59708.1; ABI84963.1; APC57870.2; GISAID: EPI243398; EPI173795; EPI168140; EPI171494; EPI168127; EPI677976; EPI138999; EPI2760375; EPI2755515; EPI2755455; EPI2737210; EPI2761157; EPI886274; EPI1922958; EPI1229955; EPI2557220; EPI1248597; EPI2748090; EPI2616223; EPI2603677; EPI1998203; EPI2220590; EPI2158641; EPI2670207; EPI181378; EPI319186; EPI1673272; EPI2587076.

факт вовлечения в эпидемический процесс млекопитающих, таких как норки, лисы, кошки, тюлени, медведи, свиньи и др. (всего 26 видов животных), создающий условия быстрой предадаптации вируса к человеку [7, 17, 18]. Возникает вопрос о филогенетической истории белка NP данного опасного варианта вируса H5N1. Оказалось, что NP вирусов H5N1 (рис. 1; штаммы отмечены звездочками), изолированных в 2022–2023 гг. от различных млекопитающих, входил в когорту II, то есть, сохранял признаки “птичьего” клайда. Сравнение аминокислотных штампов гена NP вирусов гриппа H5N1 с вирусами сезонного и пандемического вируса гриппа человека показало, что по мере персистенции в популяции млекопитающих белки NP вирусов птиц H5N1, подобно вирусу H1N1/2009pdm, теряли сходство с белком классических прототипных вирусов птиц, снизив гомологию до 80% и 67% соответственно, при исходной 100%-ной гомологии (рис. 2). Параллельно с таким снижением гомологии к вирусам птиц белок NP вируса H5N1, изолированного от млекопитающих, подобно пандемическому вирусу человека H1N1/2009pdm, приобрел частичное сходство с генетическим штампом белка NP классического вируса гриппа человека в 13% и 20% соответственно (рис. 2).

Представленные данные позволяют сделать предположение о том, что адаптация птичьего вируса H5N1 к организму млекопитающих идет по механизму постепенного сближения с NP вируса человека и отдаления от NP вируса птиц. Сходная динамика сближения с вирусами человека имела место в аналогичном процессе, произошедшем ранее в организме свиней у пандемического вируса H1N1/2009pdm на этапе, занявшем около 10 лет, до его эпидемического выхода в популяцию людей в 2009 г. [6, 12, 19] и, возможно, подобная динамика эволюции и перехода от птиц к человеку имела место ранее у эпидемического вируса H1N1/1918, вызвавшего планетарную пандемию в 1918–1920 гг., так называемую “испанку” [6, 20]. Вполне логично допустить, что аналогичный процесс смены хозяина и сцепленного изменения генетического штампа вирусных белков носил закономерный характер и вероятно происходил в природе неоднократно и раньше (на дистанции нескольких млн лет в эпоху возникновения и существования приматов [21]) при начальном биогенезе прототипа(ов) классической линии вирусов человека, ставшей затем предшественником современных эпидемических субтипов H2N2 (1957), H3N2 (1968), H1N1 (1977). Суммируя представленные данные, можно заключить, что на современном этапе в популяции людей сформировались и автономно эволюционируют две филогенетические когорты вирусов гриппа А, несущие различные прототипы гена NP “человеческого” и “птичьего/свиного” происхождения, когорты I и II соответственно (см. рис. 1).

№ а.а.	Hu	Sw	Pdm09	Min	Av
16	D	G/D*	G	G/D*	G
33	I	I	I	I	V
61	L	I	I	I	I
100	V	V	I/V*	R	R
109	V	I	I	V	I
214	K	R	R	R	R
283	P	L	L	L	L
293	K	R	R	R	R
305	K	K	K	R	R
313	Y	F	V	F	F
357	K	K	K	Q	Q
372	D	E	E	E	E
422	K	R	R	R	R
442	A	T	T	T	T
455	E	D	D	D	D
Hu % →	100	33	20	13	0
Av % →	0	67	67	87	100

Рис. 2. Сравнение аминокислотных штампов белка NP у вирусов гриппа А, изолированных от млекопитающих и птиц. Номера 15 позиций аминокислот (а.к.), формирующих генетические штампы в белке NP (м.м. 70 кДа; 498 а.к.), характерные для вирусов человека, свиньи и птиц [4, 14], указаны слева на право по порядку от N-концевого метионина. В верхней части столбцов указаны филогенетические клаиды вирусов классического гриппа человека H1N1 (Hu), классических свиных вирусов H1N1 (Sw), пандемического вируса гриппа человека H1N1/2009pdm (Pdm09), вирусов гриппа H5N1, изолированных от норок (Min), классической линии вирусов птиц H5N1 (Av). В нижней части по горизонтали приведены значения доли (%) а.к. позиций, совпадающих у данной группы вирусов с птичьими (Av) и человеческими (Hu) генетическими штампами (“genetic signatures”). Позиции а.к. показаны в общепринятом однобуквенном латинском обозначении в формате Logos (<http://weblogo.threeplusone.com/>). (*) Отмеченные позиции аминокислот имеют гетерогенность в вирусных популяциях, в которых указанная после косой линии аминокислота обнаруживается в 10–20% вирусных изолятов. Для идентификации а.к. вариаций различным фоном показаны позиции аминокислот у вирусов человека (белый фон) и вирусов птиц (серый фон). Горизонтальным штрихом обозначен фон в а.к. позиции 313 NP, которая отличается от таковой у обоих референсных вирусов.

Представленные в работе данные указывают на необходимость дальнейшего углубленного мониторинга и изучения динамики природной изменчивости гена NP у вирусов гриппа А. Получение подобных знаний открывает новые подходы к раскрытию основополагающих механизмов адаптации вирусов гриппа птиц к организму других видов животных, включая человека, лежащую в основе возникновения угрожающих пандемий, и создают платформу для системного мониторинга вирусов гриппа с целью выявления эпидемических предвестников возникновения опасной инфекции у животных и человека и принятия своевременных предупредительных мер.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в порядке личной инициативы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Walker P.J., Siddell S.G., Lefkowitz E.J., et al. Recent Changes to Virus Taxonomy Ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses // Arch. Virol. 2022. V. 167(11). P. 2429–2440.
2. Zhirnov O.P. The Unique Genome of the Virus and Alternative Strategies for its Realization // Acta Naturae. 2023. V. 15(2). P. 14–19. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11904>
3. Zhirnov O.P. The Host Origin of Influenza A Viruses Can Be Assessed by the Intracellular Cleavage of the Viral Nucleocapsid Protein // Arch. Virol. 1988. V. 99(3–4). P. 277–284.
4. Mänz B., Dornfeld D., Götz V., Zell R., Zimmermann P., Haller O., Kochs G., Schwemmler M. Pandemic Influenza A Viruses Escape from Restriction by Human MxA through Adaptive Mutations in the Nucleoprotein // PLoS Pathog. 2013. V. 9(3). P. e1003279. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003279>
5. Hall J.S., Teslaa J.L., Nashold S.W., et al. Evolution of a Reassortant North American Gull Influenza Virus Lineage: Drift, Shift and Stability // Virol. J. 2013. V. 10. P. 179.
6. Lycett S.J., Duchatel F., Digard P. A Brief History of Bird Flu // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2019. V. 374 (1775). P. 20180257.
7. WHO: Ongoing Avian Influenza Outbreaks in Animals Pose Risk to Humans. 2023, July 12: [https://www.who.int/ru/news/item/12-07-2023-ongoing-avian-influenza-outbreaks-in-](https://www.who.int/ru/news/item/12-07-2023-ongoing-avian-influenza-outbreaks-in-animals-pose-risk-to-humans)
8. Haller O., Kochs G. Mx Genes: Host Determinants Controlling Influenza Virus Infection and Trans-species Transmission // Hum. Genet. 2020. V. 139(6–7). P. 695–705.
9. Peacock T.P., Sheppard C.M., Lister M.G., et al. Mammalian ANP32A and ANP32B Proteins Drive Differential Polymerase Adaptations in Avian Influenza Virus // J. Virol. 2023. V. 97(5). P. e0021323.
10. Tome-Amat J., Ramos I., Amanor F., Fernández-Sesma A., Ashour J. Influenza A Virus Utilizes Low-Affinity, High-Avidity Interactions with the Nuclear Import Machinery to Ensure Infection and Immune Evasion // J. Virol. 2018. V. 93(1). P. e01046–18.
11. Morris A.K., Wang Z., Ivey A.L., Xie Y., Hill P.S., Schey K.L., Ren Y. Cellular mRNA Export Factor UAP56 Recognizes Nucleic Acid Binding Site of Influenza Virus NP Protein // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2020. V. 525(2). P. 259–264.
12. York I., Donis R. O. The 2009 Pandemic Influenza Virus: Where Did It Come From, Where Is It Now, and Where Is It Going? // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2013. V. 370. P. 241–257.
13. Gamarra-Toledo V., Plaza P.I., Gutiérrez R., Inga-Díaz G., Saravia-Guevara P., Pereyra-Meza O., et al. Mass Mortality of Sea Lions Caused by Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus // Emerg. Infect. Dis. 2023. V. 29 (12). P. 2553–2556. <https://doi.org/10.3201/eid2912.230192>
14. Chen G.W., Gong Y.N., Shih S.R. Influenza A Virus Plasticity – A Temporal Analysis of Species-associated Genomic Signatures // J. Formos. Med. Assoc. 2015. V. 114(5). P. 456–463.
15. Zhang B., Xu S., Liu M., et al. The Nucleoprotein of Influenza A Virus Inhibits the Innate Immune Response by Inducing Mitophagy // Autophagy. 2023. V. 19(7). P. 1916–1933.
16. Shi J., Zeng X., Cui P., Yan C., Chen H. Alarming Situation of Emerging H5 and H7 Avian Influenza and Effective Control Strategies // Emerg. Microbes Infect. 2023. V. 12(1). P. 2155072.
17. Adlhoch C., Fusaro A., Gonzales J.L., et al. Avian Influenza Overview December 2022 – March 2023 // EFSA J. 2023. V. 21 (3). P. e07917.
18. Agüero M., Monne I., Sánchez A., et al. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus Infection in Farmed Minks, Spain, October 2022 // Euro. Surveill. 2023. V. 28 (3). P. 2300001.
19. Smith G.J., Vijaykrishna D., Bahl J., et al. Origins and Evolutionary Genomics of the 2009 Swine-origin H1N1 Influenza A Epidemic // Nature. 2009. V. 459(7250). P. 1122–1125.
20. Worobey M., Han G.Z., Rambaut A. Genesis and Pathogenesis of the 1918 Pandemic H1N1 Influenza A Virus // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111 (22). P. 8107–8112.
21. Lyov D.K., Gulyukin M.I., Zaberezhniy A.D., Gulyukin A.M. Formation of Population Gene Pools of Zoonotic Viruses, Potentially Threatening Biosafety // Vopr. Virusol. 2020. V. 65(5). P. 243–258. (in Russian).

TWO PHYLOGENETIC COHORTS OF THE NUCLEOCAPSID PROTEIN NP AND THEIR CORRELATION WITH THE HOST RANGE OF INFLUENZA A VIRUSES

A. I. Chernyshova^a, Corresponding Member of the RAS O. P. Zhirnov^{a,b,#}

^a*D.I. Ivanovsky Institute of Virology, N.F. Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology,
Ministry of Health, Moscow, Russian Federation*

^b*The Russian-German Academy of Medico-Social and Biotechnological Sciences,
The Innovation Center of Skolkovo, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: zhirnov@inbox.ru*

Influenza A virus has a wide natural areal among birds, mammals and humans. One of the main regulatory adaptors of the virus host range is the major NP protein of the viral nucleocapsid. Phylogenetic analysis of the NP protein of different viruses has revealed the existence of two phylogenetic cohorts in human influenza virus population. Cohort I includes classical human viruses that caused epidemics in 1957, 1968, 1977. Cohort II includes the H1N1/2009pdm virus, which had a mixed avian-swine origin, but caused global human pandemic. Also, the highly virulent H5N1 avian influenza virus emerged in 2021 and caused outbreaks of lethal infections in mammals, including humans, appeared to have the NP gene of the second phylogenetic cohort and, therefore, by the type of adaptation to human is similar to the H1N1/2009pdm virus and seems to possess a high epidemic potential for humans. The data obtained shed light on pathways and dynamics of avian influenza viruses adaptation to humans and propose phylogenetic algorithm for systemic monitoring of dangerous virus strains to predict epidemic harbingers and take immediate preventive measures.

Keywords: influenza virus, host range, NP protein, H5N1 virus

УДК 577.214.5

ОЦЕНКА УРОВНЯ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ микроРНК НА ОСНОВАНИИ ТОТАЛЬНОГО КЛЕТОЧНОГО ПУЛА РНК АЛГОРИТМАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ

© 2024 г. Я. В. Соловьев^{1,*}, А. С. Евпак^{1,*}, А. А. Кудряева¹,
академик РАН А. Г. Габибов^{1,3}, А. А. Белогуров^{1,2}

Поступило 28.12.2023 г.

После доработки 25.01.2024 г.

Принято к публикации 03.02.2024 г.

Анализ механизмов возникновения и развития онкологических заболеваний является одной из ключевых задач современной клинической биоинформатики и молекулярной биологии. Омиксные данные пациентов, в частности транскриптом, позволяют довольно подробно описать закономерности в уровне экспрессии и посттранскрипционной регуляции различных типов РНК относительно остального транскриптома. В нашей работе мы создали набор данных, включающий в себя транскриптомные данные около 16 000 пациентов с более чем 160 типами рака, и использовали современные алгоритмы градиентного бустинга, чтобы найти сложные корреляции уровня экспрессии четырех клинически значимых микроРНК, в частности, hsa-mir-21, hsa-let-7a-1, hsa-let-7b и hsa-let-7i, с уровнем экспрессии остальных 60 660 уникальных РНК. Нам удалось показать зависимость уровня экспрессии изучаемых микроРНК от концентрации ряда малых ядрышковых РНК и регуляторных длинных некодирующих РНК, роль которых в развитии некоторых типов рака была ранее показана экспериментально. Дальнейший анализ созданной базы данных позволит выявить более широкий спектр общих зависимостей изменения уровня экспрессии различных классов РНК при разных онкологических заболеваниях, а также найти уникальные изменения, характерные для отдельных типов злокачественных трансформаций.

Ключевые слова: транскриптом, микроРНК, машинное обучение, градиентный бустинг

DOI: 10.31857/S2686738924030088, **EDN:** VTRGCG

ВВЕДЕНИЕ

МикроРНК имеют длину 18–25 нуклеотидов и представляют собой серию эволюционно консервативных одноцепочечных малых некодирующих молекул РНК [1], которые могут модулировать экспрессию генов как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях посредством связывания с 3'-нетранслируемой областью (3'UTR) целевой матричной РНК (мРНК), что приводит к деградации мРНК или ингибированию трансляции [2]. Будучи негативными регуляторными факторами экспрессии генов, микроРНК могут регулировать онкогенез

и прогрессирование рака, влияя на многочисленные биологические сигнальные пути [3].

Среди многочисленных микроРНК, ассоциированных с развитием рака, микроРНК-21 была одной из первых, которая была идентифицирована как онкогенная микроРНК [4]. Изменение экспрессии микроРНК-21 при раке может быть обусловлено эпигенетическими факторами [5], нарушением транскрипционной и посттранскрипционной регуляции во время биогенеза микроРНК или прямой репрессией микроРНК-21, что приводит к онкогенным фенотипам клеток [6].

В свою очередь, микроРНК-21 участвует в регуляции различных клеточных процессов, играющих важную роль в развитии рака. Так, микроРНК-21 связана с пролиферацией клеток через некоторые из ее мишеней, таких как PDCD4, SPRY2, PTEN и RECK. Было показано, что в клетках рака поджелудочной железы микроРНК-21 может способствовать пролиферации, путем нацеливания на SPRY2, который ингибирует пролиферацию клеток, индуцированную эпидермальным фактором роста (EGF) [7]. Помимо

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

²Российский университет медицины Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

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

*e-mail: solovev@ibch.ru

этого, микроРНК-21 регулирует MAPK/ERK и PI3K/АКТ сигнальные пути, что также оказывает влияние на модуляцию пролиферации клеток [7]. При немелкоклеточном раке легкого также было показано влияние микроРНК-21 на пролиферацию клеток посредством связывания с PDCD4 [8], а при плоскоклеточном раке легких — через PTEN и RECK [9].

Другими значимыми процессами, на которые может влиять микроРНК-21, являются инвазия и метастазирование. Так, в клеточных линиях рака молочной железы, предстательной железы, гепатоцеллюлярной карциномы и рака толстой кишки было обнаружено, что микроРНК-21 оказывает влияние на гены, связанные со снижением метастатического потенциала, такие как PDCD4, TIMP3, TPM1, SERPINB5 и PTEN. Повышение уровня экспрессии микроРНК-21 приводит к подавлению TIMP3, что, в свою очередь, способствует увеличению инвазивности клеточных линий меланомы, но не усиливает их миграционный потенциал [10]. В случае гепатоцеллюлярной карциномы было показано, что микроРНК-21 способна контролировать миграцию и инвазию, связываясь с PTEN, который подавляет экспрессию MMP-9 и MMP-2 посредством дефосфорилирования FAK [11].

Еще одним процессом, регулируемым микроРНК-21, является апоптоз. При раке молочной железы апоптоз модулируется посредством нацеливания микроРНК-21 на BCL2 и PDCD4, что также подтверждается исследованиями *in vitro* с различными типами рака [12]. Было обнаружено, что микроРНК-21 подавляет негативные регуляторы Ras/MAPK-киназы (MEK)/ERK пути, что приводит к ингибированию апоптоза [12].

Было обнаружено, что экспрессия микроРНК-21 повышается при некоторых видах рака, таких как глиобластома, аденокарцинома поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого и многие другие. В совокупности со способностью микроРНК-21 модулировать значимые для развития рака клеточные процессы, это делает ее важным биомаркером со значительным потенциалом в диагностике и прогнозировании течения рака.

Другим интересным примером участия микроРНК в регуляции процессов, ассоциированных с раком, является семейство микроРНК let-7, которое включает в себя 13 членов, кодирующих 9 зрелых микроРНК [13]. МикроРНК-let-7 относят к категории супрессоров опухолей благодаря способности снижать агрессивность течения рака и резистентность к терапии [14].

Снижение уровня экспрессии микроРНК-let-7 чаще всего связано с плохим прогнозом течения рака, поскольку микроРНК-let-7 участвует в подавлении способности раковых стволовых клеток к проли-

ферации, дифференцировке и самообновлению [15]. Белки семейства Lin28 (Lin28A и Lin28B) могут ингибировать биогенез микроРНК-let-7, связывая предшественника зрелой let-7 (pre-let-7) [14]; также некоторые lncRNA и circRNA могут связывать микроРНК-let-7, ограничивая ее доступ к мРНК генов-мишеней [16].

В поддержании способности к самообновлению и пролиферации раковых стволовых клеток участвует ряд важных сигнальных путей, таких как Wnt/ β -катенин, NOTCH/Hedgehog, STAT3/Nf- κ B, MAPK/ERK и PI3K/АКТ. МикроРНК-let-7 участвует в контроле стволовости рака, действуя как регулятор этих путей посредством петли обратной связи.

Так, например, Wnt/ β -катенин подавляет посттранскрипционную экспрессию let-7 за счет трансактивации Lin28B, супрессора биогенеза микроРНК-let-7 [17]. При этом значительное повышение экспрессии микроРНК-let-7 (например, посредством не прямой активации микроРНК-146a) ингибирует способность к самообновлению раковых стволовых клеток путем подавления передачи сигналов Wnt при раке молочной железы и других видах рака [18].

Аберрантная активация передачи сигналов NOTCH связана с фенотипом стволовости при многих видах рака. Недавние исследования продемонстрировали способность микроРНК семейства let-7 осуществлять регуляцию передачи сигналов в пути NOTCH в нескольких типах опухолевых клеток [19]. Также при раке поджелудочной железы высоко метастатические раковые клетки демонстрируют повышенный уровень экспрессии Shh (sonic hedgehog), который участвует в эмбриональном развитии и поддержании стволовости, что коррелирует с более низкими уровнями экспрессии let-7 [20]. Ингибирование Shh приводит к увеличению уровня микроРНК-let-7 и подавлению экспрессии SOX2, NANOG и EpCAM [21].

Активация факторов транскрипции, таких как STAT3 и Nf- κ B, способствует поддержанию эпигенетической и фенотипической пластичности опухоли и способности к самообновлению за счет подавления микроРНК-let-7 [22, 23]. При этом повышение уровня экспрессии микроРНК-let-7, который действует как вышестоящий супрессор Ras/Nf- κ B сигнального пути, уменьшает злокачественную трансформацию и приобретение свойств раковых стволовых клеток в нормальных кератиноцитах кожи человека [24].

Рецепторные тирозинкиназы, такие как EGFR, активируются внеклеточными лигандами, такими как EGF, с последующей активацией сигнальных путей MAPK/ERK (также известных как Ras-RAF-MEK-ERK) и PI3K-АКТ-mTOR для регуляции пролиферации, самообновления и дифференцировки клеток. Семейство микроРНК let-7 нацелено на H- и K-Ras

для регуляции активности раковых стволовых клеток. Активация экспрессии let-7a приводит к ингибированию K-Ras и подавлению стволового фенотипа раковых клеток [25].

Ряд исследований продемонстрировали способность микроРНК-let-7 и Lin28 модулировать метаболизм глюкозы и жирных кислот. Так, при раке молочной железы, Lin28A и Lin28B усиливают аэробный гликолиз, тогда как let-7 подавляет его посредством регуляции PDK1 HIF-1-независимым образом [26]. Повышенная экспрессия Lin28A/B усиливает синтез жирных кислот *de novo*, способствуя прогрессированию рака через SREBP-1 [27]. Ингибирование Lin28B нарушает рост клеток и метаболизм аминокислот при остром миелолейкозе путем дерепрессии let-7a [28]. Таким образом, подавление экспрессии Lin28 и/или восстановление экспрессии let-7 может обеспечить перспективные терапевтические стратегии лечения рака.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовался составной набор парных транскриптомных данных для 15964 пациентов с разными онкологическими диагнозами (таблицу с ID номерами пациентов можно получить у автора для переписки), полученный из базы данных Атласа ракового генома: <https://www.cancer.gov/tcga> (англ. *The Cancer Genome Atlas*). Для обучения были отобраны 60660 уникальных РНК, в числе которых были белок-кодирующие, рибосомальные, малые ядерные, малые ядрышковые, длинные некодирующие РНК, а также РНК псевдогенов. Набор микроРНК содержал 1881 уникальный компонент. Для валидации методики на первом этапе нами были отобраны 2 клинически значимые микроРНК: семейство микроРНК-let-7, представленное 3-мя различными членами, и микроРНК-21.

Перед применением алгоритмов статистического анализа и машинного обучения данные были рандомизированы (перемешаны) по строкам для избежания эффекта кластеризации вхождений по типам рака. Для обучения был отобраны 14368 случайных пациентов, валидация моделей осуществлялась на тестовом наборе данных из 1596 пациентов. В обоих датасетах были представлены все имеющиеся типы раков. Для машинного обучения использовалась библиотека градиентного бустинга LightGBM версии 3.3.4 [29]. Подбор оптимальных параметров моделей осуществлялся модифицированным протоколом GridSearchCV из библиотеки sklearn версии 1.2.0 [30]. Модификация состояла в использовании динамической грид-сетки, где величина изменения каждого гиперпараметра зависела от результата работы модели на прошлом этапе. Так, для каждой модели подбирались оптимальные глубина и число

деревьев, а также число “листьев” модели. На первом этапе валидация гиперпараметров осуществлялась на обучающей выборке методом k-fold, данные итеративно разбивались на тренировочные и тестовые подмножества в пропорции 5: 1. Оптимальные модели, в дальнейшем, валидировались на тестовом наборе данных. Для оценки линейной корреляции использовался коэффициент корреляции Пирсона, реализованный в библиотеке NumPy версии 1.23.5 [31]. Для визуализации данных использовалась библиотека Plotly версии 5.6.0 [32].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе мы оценили качество работы выбранного алгоритма градиентного бустинга для предсказания абсолютных значений уровней экспрессии выбранных микроРНК для тренировочного и тестового набора данных. Оценка включала в себя анализ сонаправленности линий линейной корреляции и значений R^2 между актуальными и предсказанными значениями в обучающей и тестовой выборке. Результаты работы моделей для четырех изучаемых микроРНК представлены на рис. 2 (пункты 1, 3, 5, 7). На основании полученных данных можно утверждать, что после оптимизации гиперпараметров каждой модели алгоритм LightGBM Regressor способен уверенно описать основные зависимости для микроРНК hsa-mir-21 ($R^2 = 0.8$) и для микроРНК hsa-let-7i ($R^2 = 0.86$). Для двух других членов семейства микроРНК hsa-let-7 градиентный бустинг показал чуть менее высокое качество оценки результатов на тестовом наборе данных: $R^2 = 0.63$ для hsa-let-7a-1 и $R^2 = 0.58$ для hsa-let-7b соответственно. Важно отметить, что во всех моделях наблюдается крайне высокая сонаправленность между графиками линейных корреляций для тренировочных и тестовых значений, что говорит об отсутствии значимых не охарактеризованных зависимостей в тренировочных наборах относительно тестового множества. Также следует подчеркнуть важность подбора оптимальных гиперпараметров. Так, в частности, важность оптимизации числа деревьев и числа “листьев”, особенно в случае микроРНК hsa-let-7a-1 и hsa-let-7b, — недостаточное число деревьев быстро приводило к значительному падению качества оценки тестового набора данных. Напротив, избыточное число деревьев решений и значительное число “листьев” несколько ухудшало прогноз за счет переобучения алгоритма, что было особенно заметно на кросс-валидационных тестах, в которых модели одинаковой архитектуры обучались на разных наборах тренировочных и тестовых данных.

Дополнительным подходом оценки качества работы модели машинного обучения является характеристика распределения величины ошибок для тестовых наборов данных, результаты анализа представлены на рис 1.

В нашем случае все модели имеют сходные распределения величин ошибки, только в случае микроРНК hsa-let-7b наблюдается чуть более высокий средний процент ошибок: 44.8% против 37.3% для hsa-mir-21 и 29.6% для hsa-let-7i. В нашем случае, однако, более показательным критерием может выступать величина квантиля 0.9 (максимальная ошибка для 90% выборки, ранжированной по возрастанию величины ошибки) ввиду наличия единичных уникальных артефактных образцов, для которых разница между предсказанными и актуальными значениями составляет до 4 порядков. Так, для микроРНК hsa-mir-21 квантиль 0.9 равен 68.4%, для микроРНК hsa-let-7a-1 – 61.7%, для микроРНК hsa-let-7b – 82% и для микроРНК hsa-let-7i – 63.6%. Отдельно отметим, что попытки кластеризовать и охарактеризовать отдельно имеющийся набор данных по типам рака или по сходству уровня экспрессии РНК для снижения величины ошибки принесли обратный эффект, таким образом, наличие максимально разнообразных данных способствует увеличению качества модели, позволяя выявить закономерности, которые отсутствуют или очень слабо выражены в отдельных типах рака.

Для более детального анализа работы созданных моделей мы выявили и охарактеризовали РНК, имеющие наибольший вклад в качество работы модели. Анализ вклада дескрипторов, ключевых для предсказания членов семейства микроРНК hsa-let-7 и микроРНК hsa-mir-21, представлен на рис. 2 (пункты 2, 4, 6, 8). Основной задачей было оценить биологическую значимость РНК, вносящих основной вклад в работу предсказательной модели. Так, например, для микроРНК-21 количество мРНК тромбоцитарного фактора роста ТУМР является ключевым относительно остальных РНК, ее вклад составляет 25.5%. Клиническая значимость сверхэкспрессии ТУМР ранее была показана для рака почки и глиомы низкой степени злокачественности [33]. Количество мРНК активатора плазминогена урокиназного типа PLAУ и мРНК белка мембраны вакуолей первого типа VMP1, ассоциированного с развитием рака поджелудочной железы [34, 35], также существенно, их вклад составляет 8.25% и 5.5% соответственно. Сверхэкспрессия гена PLAУ ассоциирована с плоскоклеточным раком пищевода [36] и является негативным маркером прогноза времени дожития пациента. Более детальный анализ компонентов модели позволил выявить минорные вклады антисмысловой РНК PDCD4-AS1, мРНК нескольких типов матриксных металло-протеаз (в том числе MMP-2), мРНК ингибитора сериновых эндо-протеаз SERPINB5 и мРНК анти-апоптотического фактора BCL2L12, для которых ранее было показано участие в развитии разных типов онкологии.

Похожий характер распределения наблюдается для микроРНК-let-7i, где ключевую роль играет ма-

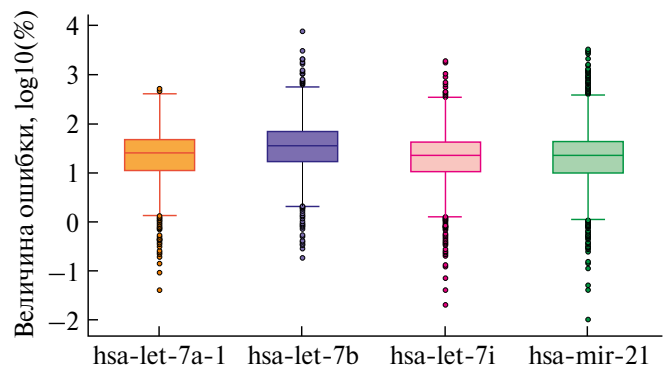


Рис. 1. Распределение величины процента ошибки относительно актуальных значений для тестовых наборов данных.

лая ядрышковая РНК (мяРНК) SNORA49 – ее вклад составляет 52.3%, что на порядок больше следующей по важности РНК белка рибосомы RPL5P8, чья значимость оценивается в 4.5%. Не так давно было показана разница в уровне экспрессии мяРНК SNORA49 в здоровой ткани и при аденокарциноме легкого [37]. Участие рибосомальных белков семейства RPL5 в развитии разных онкологических заболеваний, в том числе рака груди, также было подтверждено недавними исследованиями [38]. При этом ассоциированные с раком яичников [39] и раком желудка [40] длинные некодирующие РНК LINC01465 и LINC01050 имеют вклад по 0.8% в общее качество модели. Некоторые ранее описанные гены-мишени микроРНК-let-7i также имеют незначительные вклады (менее 0.1%) в модель, в частности, мРНК генов Notch2, PDK1, STAT2 и STAT4, мРНК псевдогенов Nanog 2, 4, 5, 7 и 11, а также мРНК псевдогена Lin28AP1. По-видимому, они являются значимыми для описания небольших групп пациентов, но не являются ключевыми для оценки уровня экспрессии самой микроРНК.

В то же время распределение весов ключевых РНК для микроРНК-let-7a-1 имеет принципиально другой характер. Все РНК имеют незначительный вес, не более 6.1% для малой ядрышковой РНК SNORA12 (ассоциирована с раком легкого [41]). Для оценки количества этой микроРНК также важны количества РНК рибосомального белка RPL5P8 (2.3%), мРНК фосфат-зависимой убиквитин-лигазы FBXO7 семейства F-box (низкий уровень экспрессии или мутации которой связаны с развитием карциномы эндометрия [42]) и мРНК гомеобокс-содержащего гена MEIS1, для которого ранее была показана связь с развитием миелоидной лейкемии [43].

Уровень экспрессии микроРНК-let-7b зависит, главным образом, от двух РНК: мРНК тяжелой цепи ферритина FTH1 и длинной некодирующей РНК

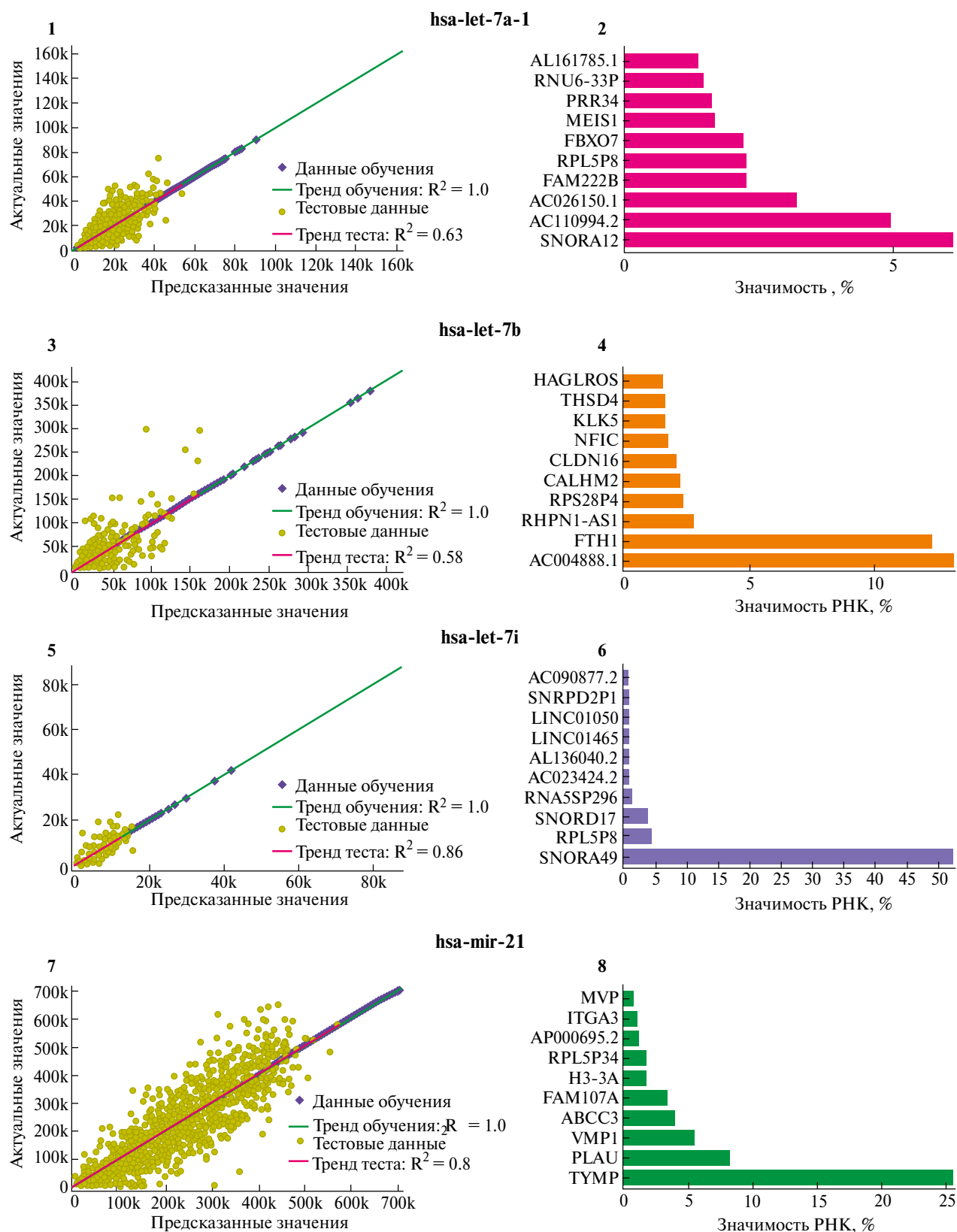


Рис. 2. Анализ качества работы машинного обучения на обучающих и тестовых наборах данных (пункты 1, 3, 5, 7) и анализ вклада ключевых РНК в работу каждой модели (пункты 2, 4, 6, 8).

AC004888.1, вклад каждой из них составляет около 12.5%. Высокий уровень экспрессии FTH1 ассоциирован с благоприятным прогнозом для пациентов с раком груди [44], в тоже время гиперэкспрессия AC004888.1 относительно здоровой ткани наблюдается у пациентов с раком яичников [45]. Следующая по важности антисмысловая РНК RHPN1-AS1, ассоциированная с увеальной меланомой и раком яичников [46, 47], имеет вклад существенно ниже — около 2.75%.

Для сравнения важности отдельных РНК для обучения моделей градиентного бустинга и степенью их линейной корреляции с изучаемой микроРНК мы оценили коэффициенты корреляции Пирсона между четырьмя изучаемыми микроРНК и 60660 остальными РНК. Ранжированные гистограммы приведены на рис. 3.

Для микроРНК hsa-let-7b РНК генов FTH1 и AC004888.1 имеют одни из наибольших коэффициентов корреляции, что совпадает с оценкой их важности алгоритмом градиентного бустинга. То же можно сказать о коэффициенте корреляции РНК гена TYMP для микроРНК hsa-mir-21, а также микроРНК SNORA49 и SNORA12 для микроРНК hsa-let-7i

и микроРНК hsa-let-7a-1 соответственно. Однако нужно особо подчеркнуть, что даже для приведенных выше примеров величина коэффициента Пирсона соответствует слабой корреляции и даже в случае микроРНК SNORA49 и микроРНК hsa-let-7i едва ли соответствует средней. В целом, следует отметить, что за исключением микроРНК hsa-let-7i все остальные микроРНК имеют слабые линейные корреляции с другими РНК, что накладывает существенные ограничения на выбор алгоритмов машинного обучения. Кроме того, очевидно, что простая линейная зависимость не отражает сложных зависимостей, присутствующих в анализируемом датасете — РНК с лучшими коэффициентами корреляции практически не вносят существенного вклада в работу моделей градиентного бустинга. С другой стороны, следует отметить важность минорных компонентов — при попытке удаления из обучающего набора данных тех или иных РНК с следовым вкладом в качестве модели возникали новые артефактные предсказания. Это свидетельствует о том, что минорные компоненты критически необходимы для качественной характеристики небольших групп пациентов, имеющих уникальный паттерн экспрессии некоторых РНК.

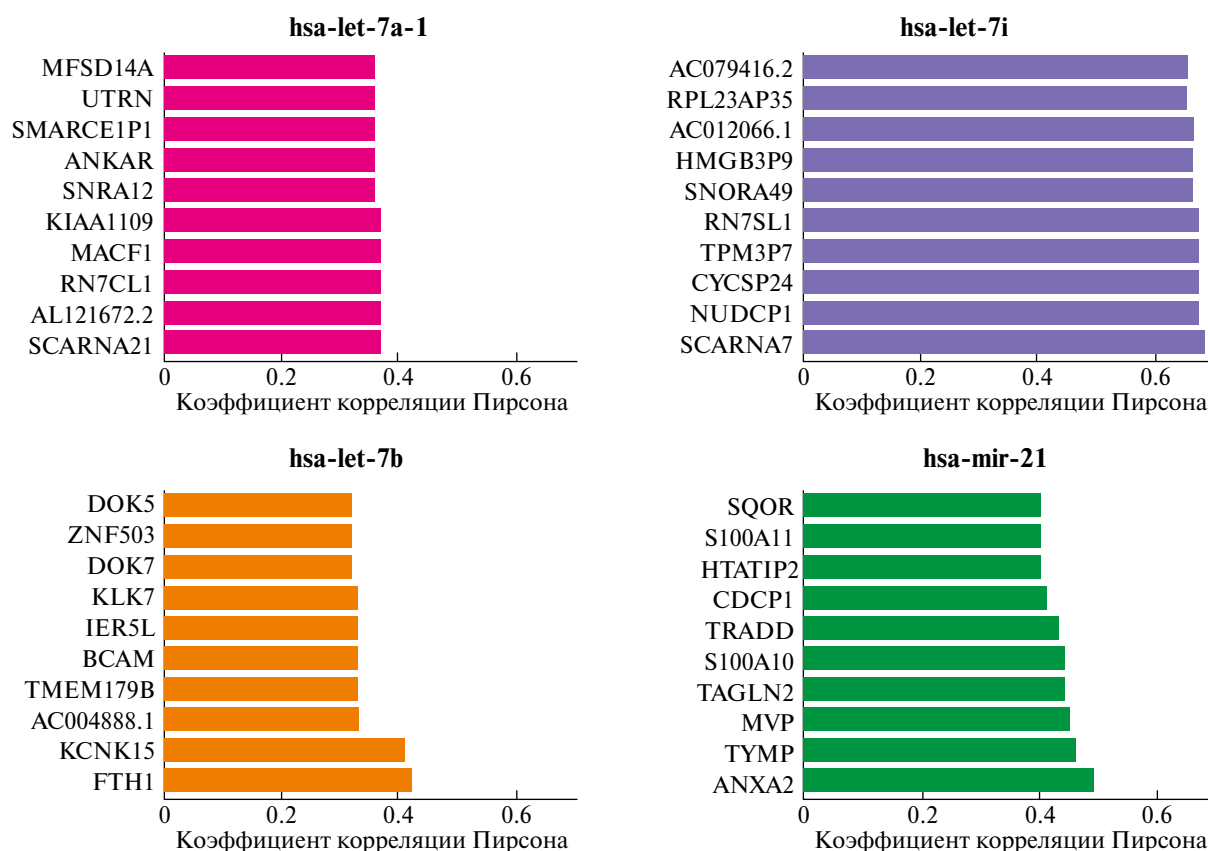


Рис. 3. Соотношение 10 РНК, имеющих наибольшие абсолютные значения коэффициентов корреляции Пирсона, с целевыми микроРНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценка абсолютных значений уровней экспрессии клинически значимых микроРНК является важной биоинформатической задачей, имеющей непосредственное практическое применение. Однако не менее важная работа состоит в поиске закономерностей между разными типами РНК, оценке их взаимного влияния в норме и при различных патологиях. В рамках нашего исследования мы показали наличие крайне сложных закономерностей между четырьмя клинически значимыми микроРНК и остальным транскриптомом. Адекватное описание подобных механизмов взаимного влияния является вызовом даже для самых современных алгоритмов машинного обучения. Несмотря на это, градиентный бустинг LightGBM смог выявить основные зависимости для микроРНК hsa-let-7i и микроРНК hsa-mir-21, показав высокую предсказательную силу моделей на тестовых наборах данных. Для микроРНК hsa-let-7b и hsa-let-7a-1 удалось обнаружить только основные зависимости, которые, однако, дают новое представление о механизмах их регуляции при изучаемых типах рака.

Важно отметить, что несмотря на значительную предсказательную силу каждой полученной модели, все они имеют разный паттерн соотношений вкладов ключевых РНК в предсказание выбранной микроРНК. В сочетании с низкими уровнями линейной корреляции Пирсона между ключевыми РНК и целевой микроРНК это позволяет сделать вывод о крайне нетривиальных зависимостях между уровнями экспрессии микроРНК и остальными РНК в клетке. Кроме того, многие важные для моделей градиентного бустинга РНК являются не-белок-кодирующими, что говорит о комплексной системе взаимной регуляции между разными типами некодирующих РНК. Большая часть приведенных выше некодирующих РНК ассоциирована с определенным типом рака, что дает основание предполагать наличие специфических взаимосвязей между регуляторными РНК, уникальных для разных тканей [34, 48, 49]. Вероятно, нарушение уровня специфических не-белок-кодирующих РНК может приводить к развитию онкологии в той же мере, как и более широко изученные отклонения в уровне экспрессии ряда транскрипционных факторов и циклинов. Использованный в нашей работе набор данных включал в себя более двух десятков различных онкологических заболеваний, что позволило выявить на первом этапе ключевые закономерности между уровнями экспрессии изучаемых микроРНК при различных злокачественных новообразованиях. Более детальный анализ вкладов в описание конкретных онкологических заболеваний позволит выявить дополнительные РНК, имеющие минорные вклады в существующей универсальной модели. Кроме того, дальнейшее расширение набо-

ра изучаемых микроРНК позволит выявить больше не-белок-кодирующих РНК, ассоциированных с развитием разных типов рака.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 17-74-30019.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lorenzi L., et al.* The RNA Atlas Expands the Catalog of Human Non-coding RNAs // *Nat. Biotechnol.* 2021. V. 39. № 11. P. 1453–1465. doi:10.1038/s41587-021-00936-1
2. *Jens M., Rajewsky N.* Competition between Target Sites of Regulators Shapes Post-transcriptional Gene Regulation // *Nat. Rev. Genet.* 2015. V. 16. № 2. P. 113–126. doi: 10.1038/nrg3853
3. *Lee Y.S., Dutta A.* MicroRNAs in Cancer // *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2009. V. 4. № 1. P. 199–227. doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092222
4. *Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T.* Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs // *Science.* 2001. V. 294. № 5543. P. 853–858. doi: 10.1126/science.1064921
5. *Ferraro A., et al.* Epigenetic Regulation of miR-21 in Colorectal Cancer: ITGB4 as a Novel miR-21 Target and a Three-gene Network (miR-21-ITGB4-PDCD4) as Predictor of Metastatic Tumor Potential // *Epigenetics.* 2014. V. 9. № 1. P. 129–141. doi: 10.4161/epi.26842
6. *Kumarswamy R., Volkmann I., Thum T.* Regulation and Function of miRNA-21 in Health and Disease // *RNA Biol.* 2011. V. 8. № 5. P. 706–713. doi: 10.4161/rna.8.5.16154
7. *Zhao Q., et al.* miR-21 Promotes EGF-induced Pancreatic Cancer Cell Proliferation by Targeting Spry2 // *Cell Death Dis.* 2018. V. 9. № 12. P. 1157. doi: 10.1038/s41419-018-1182-9
8. *Yang Y., et al.* Downregulation of microRNA-21 Expression Restrains Non-small Cell Lung Cancer Cell Proliferation and Migration through Upregulation of Programmed Cell Death 4 // *Cancer Gene Ther.* 2015. V. 22. № 1. P. 23–29. doi: 10.1038/cgt.2014.66
9. *Xu L., Wu Z., Chen Y., Zhu Q., Hamidi S., Navab R.* MicroRNA-21 (miR-21) Regulates Cellular Proliferation, Invasion, Migration, and Apoptosis by Targeting PTEN, RECK and Bcl-2 in Lung Squamous Carcinoma, Gejiu City, China // *PLoS ONE.* 2014. V. 9. № 8. P. e103698. doi: 10.1371/journal.pone.0103698
10. *Martin Del Campo S.E., et al.* MiR-21 Enhances Melanoma Invasiveness via Inhibition of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 3 Expression: In Vivo Effects of MiR-21 Inhibitor // *PLOS ONE.* 2015. V. 10. № 1. P. e0115919. doi: 10.1371/journal.pone.0115919
11. *Meng F., Henson R., Wehbe-Janek H., Ghoshal K., Jacob S. T., Patel T.* MicroRNA-21 Regulates Expression of the PTEN Tumor Suppressor Gene in Human Hepatocellular

- Cancer // Gastroenterology. 2007. V. 133. № 2. P. 647–658. doi: 10.1053/j.gastro.2007.05.022
12. *Hatley M.E., et al.* Modulation of K-Ras-Dependent Lung Tumorigenesis by MicroRNA-21 // *Cancer Cell*. 2010. V. 18. № 3. P. 282–293. doi: 10.1016/j.ccr.2010.08.013
13. *Lee H., Han S., Kwon C.S., Lee D.* Biogenesis and Regulation of the let-7 miRNAs and Their Functional Implications // *Protein Cell*. 2016. V. 7. № 2. P. 100–113. doi: 10.1007/s13238-015-0212-y
14. *Balzeau J., Menezes M.R., Cao S., Hagan J.P.* The LIN28/let-7 Pathway in Cancer // *Front. Genet*. 2017. V. 8. doi: 10.3389/fgene.2017.00031
15. *Yu F., et al.* let-7 Regulates Self Renewal and Tumorigenicity of Breast Cancer Cells // *Cell*. 2007. V. 131. № 6. P. 1109–1123. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.054
16. *Kallen A.N., et al.* The Imprinted H19 LncRNA Antagonizes Let-7 MicroRNAs // *Mol. Cell*. 2013. V. 52. № 1. P. 101–112. doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.027
17. *Cai W.-Y., et al.* Wnt/ β -catenin Pathway Represses let-7 microRNAs Expression via Transactivation of Lin28 to Augment Breast Cancer Stem Cell Expansion // *J. Cell Sci*. 2013. P. jcs.123810. doi: 10.1242/jcs.123810
18. *Liang R., et al.* MiR-146a Promotes the Asymmetric Division and Inhibits the Self-renewal Ability of Breast Cancer Stem-like Cells via Indirect Upregulation of Let-7 // *Cell Cycle*. 2018. V. 17. № 12. P. 1445–1456. doi: 10.1080/15384101.2018.1489176
19. *Bao B., et al.* Metformin Inhibits Cell Proliferation, Migration and Invasion by Attenuating CSC Function Mediated by Deregulating miRNAs in Pancreatic Cancer Cells // *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)*. 2012. V. 5. № 3. P. 355–364. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0299
20. *Luo G., et al.* Highly Lymphatic Metastatic Pancreatic Cancer Cells Possess Stem Cell-like Properties // *Int. J. Oncol*. 2013. V. 42. № 3. P. 979–984. doi: 10.3892/ijo.2013.1780
21. *Ahmad A., et al.* Inhibition of Hedgehog Signaling Sensitizes NSCLC Cells to Standard Therapies through Modulation of EMT-regulating miRNAs // *J Hematol Oncol*. 2013. V. 6. № 1. P. 77. doi: 10.1186/1756-8722-6-77
22. *Alam M., Ahmad R., Rajabi H., Kufe D.* MUC1-C Induces the LIN28B-LET-7-HMGA2 Axis to Regulate Self-Renewal in NSCLC // *Mol. Cancer Res*. 2015. V. 13. № 3. P. 449–460. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0363
23. *Guo L., et al.* Stat3-coordinated Lin-28-let-7-HMGA2 and miR-200-ZEB1 Circuits Initiate and Maintain Oncostatin M-driven Epithelial-Mesenchymal Transition // *Oncogene*. 2013. V. 32. № 45. P. 5272–5282. doi: 10.1038/onc.2012.573
24. *Jiang R., et al.* The Acquisition of Cancer Stem Cell-like Properties and Neoplastic Transformation of Human Keratinocytes Induced by Arsenite Involves Epigenetic Silencing of let-7c via Ras/NF- κ B // *Toxicol. Lett*. 2014. V. 227. № 2. P. 91–98. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.03.020
25. *Appari M., Babu K.R., Kaczorowski A., Gros W., Her I.* Sulforaphane, Quercetin and Catechins Complement Each Other in Elimination of Advanced Pancreatic Cancer by miR-let-7 Induction and K-ras Inhibition // *Int. J. Oncol*. 2014. V. 45. № 4. P. 1391–1400. doi: 10.3892/ijo.2014.2539
26. *Ma X., et al.* Lin28/let-7 Axis Regulates Aerobic Glycolysis and Cancer Progression via PDK1 // *Nat. Commun*. 2014. V. 5. № 1. P. 5212. doi: 10.1038/ncomms6212
27. *Zhang Y., et al.* Lin28 Enhances *De Novo* Fatty Acid Synthesis to Promote Cancer Progression via SREBP-1 // *EMBO Rep*. 2019. V. 20. № 10. P. e48115. doi: 10.15252/embr.201948115
28. *Zhou J., et al.* Inhibition of LIN28B Impairs Leukemia Cell Growth and Metabolism in Acute Myeloid Leukemia // *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol*. 2017. V. 10. № 1. P. 138. doi: 10.1186/s13045-017-0507-y
29. *Ke G., et al.* LightGBM: A Highly Efficient Gradient Boosting Decision Tree // *Proceedings of the 31st International Conference on Neural Information Processing Systems, NIPS'17*. Red Hook, NY, USA: Curran Associates Inc., 2017. P. 3149–3157.
30. *Pedregosa F., et al.* Scikit-learn: Machine Learning in Python // *J. Mach. Learn. Res*. 2011. V. 12. P. 2825–2830.
31. *Harris C.R., et al.* Array Programming with NumPy // *Nature*. 2020. V. 585. № 7825. P. 357–362. doi: 10.1038/s41586-020-2649-2
32. Plotly Technologies Inc. Collaborative data science. Montréal, QC, 2015. <https://plot.ly>. Ссылка активна на 10 июля 2024 г.
33. *Yang Y., et al.* A Comprehensive Pan-cancer Analysis on the Immunological Role and Prognostic Value of TYMP in Human Cancers // *Transl. Cancer Res*. 2022. V. 11. № 9. P. 3187–3208. doi: 10.21037/tcr-22-502
34. *Blum A.E., et al.* RNA Sequencing Identifies Transcriptionally Viable Gene Fusions in Esophageal Adenocarcinomas // *Cancer Res*. 2016. V. 76. № 19. P. 5628–5633. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0979
35. *Vaccaro M.I., Mitchell F., Rivera F., Gonzalez C.D.* Protein Expression in Exocrine Pancreatic Diseases. Focus on VMP1 Mediated Autophagy // *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. V. 132. Elsevier, 2022. P. 175–197. doi: 10.1016/bs.apcsb.2022.07.001
36. *Fang L., et al.* PLAU Directs Conversion of Fibroblasts to Inflammatory Cancer-associated Fibroblasts, Promoting Esophageal Squamous Cell Carcinoma Progression via uPAR/Akt/NF- κ B/IL8 Pathway // *Cell Death Discov*. 2021. V. 7. № 1. P. 32. doi: 10.1038/s41420-021-00410-6
37. *Roberts A.G.K., Catchpoole D.R., Kennedy P.J.* Identification of Differentially Distributed Gene Expression and Distinct Sets of Cancer-related Genes Identified by Changes in Mean and Variability // *NAR Genomics Bioinforma*. 2022. V. 4. № 1. P. lqab124. doi: 10.1093/nargab/lqab124
38. *Fancello L., Kampen K.R., Hofman I.J.F., Verbeeck J., Keersmaecker K.D.* The Ribosomal Protein Gene RPL5 is a Haploinsufficient Tumor Suppressor in Multiple Cancer Types // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 9. P. 14462–14478. doi: 10.18632/oncotarget.14895
39. *Malgundkar S.H., et al.* Identification and Validation of a Novel Long Non-coding RNA (LINC01465) in Ovarian Cancer // *Hum. Cell*. 2022. V. 36. № 2. P. 762–774. doi: 10.1007/s13577-022-00842-x
40. *Ji Z., et al.* C-Myc-activated Long Non-coding RNA LINC01050 Promotes Gastric Cancer Growth and Metastasis by Sponging miR-7161-3p to Regulate SPZ1 Expression // *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2021. V. 40. № 1. P. 351. doi: 10.1186/s13046-021-02155-7
41. *Gao L., et al.* Genome-wide Small Nucleolar RNA Expression Analysis of Lung Cancer by Next-generation Deep Sequencing // *Int. J. Cancer*. 2015. V. 136. № 6. doi: 10.1002/ijc.29169
42. *Zhang H., et al.* FBXO7, a Tumor Suppressor in Endometrial Carcinoma, Suppresses INF2-associated Mitochondrial Division // *Cell Death Dis*. 2023. V. 14. № 6. P. 368. doi: 10.1038/s41419-023-05891-0
43. *Okada Y., et al.* Homeodomain Proteins MEIS1 and PBXs Regulate the Lineage-specific Transcription of the Platelet Factor 4 Gene // *Blood*. 2003. V. 101. № 12. P. 4748–4756. doi: 10.1182/blood-2002-02-0380

44. *Ali A., et al.* Ferritin Heavy Chain (FTH1) Exerts Significant Antigrowth Effects in Breast Cancer Cells by Inhibiting the Expression of c-MYC // *FEBS Open Bio*. 2021. V. 11. № 11. P. 3101–3114. doi: 10.1002/2211-5463.13303
45. *Meng L., Zhang Q., Huang X.* Abnormal 5-methylcytosine lncRNA Methyome is Involved in Human High-grade Serous Ovarian Cancer // *Am. J. Transl. Res.* 2021. V. 13. № 12. P. 13625–13639.
46. *Lu L., et al.* The Long Non-Coding RNA RHPN1-AS1 Promotes Uveal Melanoma Progression // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 1. P. 226. doi: 10.3390/ijms18010226
47. *Wang J., et al.* Long Non-coding RNA RHPN1-AS1 Promotes Tumorigenesis and Metastasis of Ovarian Cancer by Acting as a ceRNA against miR-596 and Upregulating LETM1 // *Aging*. 2020. V. 12. № 5. P. 4558–4572. doi: 10.18632/aging.102911
48. *Qian Y., Shi L., Luo Z.* Long Non-coding RNAs in Cancer: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Therapy // *Front. Med.* 2020. V. 7. P. 612393. doi: 10.3389/fmed.2020.612393
49. *Chen X., Sun Z.* Novel lincRNA Discovery and Tissue-Specific Gene Expression across 30 Normal Human Tissues // *Genes*. 2021. V. 12. № 5. P. 614. doi: 10.3390/genes12050614

EVALUATION OF CLINICALLY SIGNIFICANT miRNAs LEVEL BY MACHINE LEARNING APPROACHES UTILIZING TOTAL TRANSCRIPTOME DATA

**Ya. V. Solov'ev^{a, #}, A. S. Evpak^{a, #}, A. A. Kudriaeva^a,
Academician of the RAS A. G. Gabibov^{a, c}, A. A. Belogurov, Jr.^{a, b}**

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

^b*Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation*

^c*M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: solov'ev@ibch.ru*

Analysis of the mechanisms underlying the occurrence and progression of cancer represents a key objective in contemporary clinical bioinformatics and molecular biology. Utilizing omics data, particularly transcriptomes, enables a detailed characterization of expression patterns and post-transcriptional regulation across various RNA types relative to the entire transcriptome. Here, we assembled a dataset comprising transcriptomic data from approximately 16,000 patients encompassing over 160 types of cancer. We employed state-of-the-art gradient boosting algorithms to discern intricate correlations in the expression levels of four clinically significant microRNAs, specifically hsa-mir-21, hsa-let-7a-1, hsa-let-7b, and hsa-let-7i, with the expression levels of the remaining 60,660 unique RNAs. Our analysis revealed a dependence of the expression levels of the studied microRNAs on the concentrations of several small nucleolar RNAs and regulatory long non-coding RNAs. Notably, the roles of these RNAs in the development of specific cancer types had been previously established through experimental evidence. Subsequent evaluation of the created database will facilitate the identification of a broader spectrum of overarching dependencies related to changes in the expression levels of various RNA classes in diverse cancers. In future it will make possible discovery of unique alterations specific to certain types of malignant transformations.

Keywords: transcriptome, miRNA, machine learning, gradient boosting

УДК 612.13, 577.35

ЧАСТОТНО-ЗАВИСИМАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ВРЕМЕНИ ПРОХОЖДЕНИЯ ПУЛЬСОВОЙ ВОЛНЫ. ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

© 2024 г. А. А. Гриневич^{1,*}, Н. К. Чемерис^{1,**}

Рекомендовано академиком РАН В.Н. Шабалиным

Поступило 15.01.2024 г.

После доработки 02.02.2024 г.

Принято к публикации 10.02.2024 г.

Динамика пульсовой волны (ПВ), связанная с вариабельностью времени прохождения ПВ (ВВПВ), определяет вариабельность периферического пульса, используемого как суррогат вариабельности сердечного ритма (ВСР). Цель работы — анализ частотно-зависимой динамики ВВПВ и выявление возможной частотно-фазовой модуляции колебаний скорости ПВ на пути следования от сердца к мягким тканям дистальных участков верхних конечностей. В работе использованы записи RR-интервалов и синхронные с ними записи фотоплетизмограмм 12-ти условно здоровых испытуемых из открытой базы данных PhysioNet. При помощи преобразования Гильберта—Хуанга выявлены 3 спектральных компонента ВВПВ и ВСР. Показано, что амплитуды колебаний ВВПВ были в разы (до 8.4 раза) меньше амплитуд ВСР, а пики спектральных компонент ВВПВ были сдвинуты в сторону более высоких частот, чем у ВСР. Выявлены функциональные связи между ВВПВ и ВСР, которые могут определять фазовую модуляцию периодических изменений скорости распространения ПВ.

Ключевые слова: сердечно-сосудистая система, время прохождения пульсовой волны, метод Гильберта—Хуанга, вейвлет-анализ

DOI: 10.31857/S2686738924030098, **EDN:** VTQFDC

Вариабельность сердечного ритма (ВСР) широко используется как маркер участия симпатической и парасимпатической нервной системы в регуляции частоты сердечных сокращений [1]. В последние несколько лет в качестве суррогата ВСР используется вариабельность частоты периферического пульса (ВЧП, pulse rate variability (PRV)), которая формируется прохождением пульсовой волны по дистальным участкам сосудистого русла мягких тканей и вызывает их периодическое пульсовое кровенаполнение [2–4]. Предполагается, что подход на основе измерения ВЧП позволяет достаточно полно описать динамику ВСР. Однако взаимосвязь между ВЧП и ВСР еще не до конца изучена и понятна, так как на исходную вариабельность пульсовой волны по мере ее продвижения по сосудистому руслу от сердца

до микрососудов дистальных участков мягких тканей могут влиять различные нейрогуморальные и структурные факторы, играющие ключевую роль в регуляции кровотока [5–6]. Важно уметь различать эти факторы по характерным динамическим свойствам, например, по временному масштабу. Исходя из динамики процессов, регулирующих ВСР, в первом приближении факторы можно разделить по времени на: быстрые — нейрогенные, средние — гуморальные и медленные — структурные. При этом первые два фактора преимущественно занимают отрезок времени от единиц секунд до сотен минут [1].

Ранее было продемонстрировано, что в отличие от традиционно используемого метода Фурье-анализа временных рядов кардиоинтервалов, извлеченных из ЭКГ, метод Гильберта—Хуанга (Г—Х) позволяет разложить колебания кардиоинтервалов на эмпирические моды, центральные частоты которых попадают в традиционно выделяемые частотные интервалы, что открывает новые возможности для анализа кардиоритма [7]. Использование метода Г—Х позволило выявить в динамике пульсового кровенаполнения мягких тканей подушечек указательных пальцев рук эмпирические моды, модулирующие кардиоритм в диапазоне частот от 1 до 0.01 Гц и менее, что свидетельствует о возможности количественно оценивать

¹Институт биофизики клетки Российской академии наук — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Федеральный исследовательский центр “Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Пушкино, Россия

*e-mail: grin_aa@mail.ru

**e-mail: nikolai.chemeris@mail.ru

динамическую вариабельность времени прохождения пульсовой волны (ВВПВ) на разных частотно-временных масштабах [8].

Целью данной работы были проведение пилотного исследования для анализа частотно-зависимой динамики вариабельности времени прохождения пульсовой волны и выявления возможной частотно-фазовой модуляции колебаний ее скорости на пути следования от сердца к мягким тканям дистальных участков верхних конечностей на ограниченной группе условно здоровых испытуемых.

В исследовании использованы ряды записей RR-интервалов между последовательными сердечными сокращениями и синхронные с ними записи фотоплетизмограмм (ФПГ) с циклическим кровенаполнением мягких тканей указательного пальца левой руки 12-ти условно здоровых испытуемых (8 мужчин и 4 женщины) из открытой базы ранее зарегистрированных физиологических сигналов PhysioNet [9–10]. По данным используемой базы данных Pulse Transit Time PPG Dataset (version 1.1.0) [9] испытуемые имели следующие антропометрические показатели (среднее $\pm$ стандартная ошибка): возраст 30.0 ± 2.7 года; рост 174.0 ± 2.8 см; вес 73.8 ± 5.2 кг; систолическое артериальное давление (АД) 122.2 ± 4.6 и диастолическое АД 76.8 ± 1.7 мм рт. ст. Ряды RR-интервалов были рассчитаны как интервалы времени между последовательными R-зубцами электрокардиограмм (ЭКГ) и характеризовали динамику центрального пульса. Ряды PP-интервалов были рассчитаны из записей ФПГ как последовательность интервалов между преданакротическими P-зубцами ФПГ [11] и характеризовали динамику периферического пульса. Время прохождения пульсовой волны (ВВПВ) определяли как временную задержку между пиками P- и R-зубцов, а последовательность этих времен была использована для расчета динамики ВВПВ.

Для анализа частотных спектров ВСР и ВВПВ использовали комбинацию методов Г–Х [12–13] и вейвлет-анализа, при этом спектральный метод вейвлет-анализа использовался для построения и визуализации амплитудно-частотных спектров эмпирических мод, полученных методом Г–Х. Для сглаживания и аппроксимации спектров эмпирических мод использовалась функция Вейбулла. Частотно-зависимые коэффициенты передачи сигналов от ВСР к ВЧП вычислялись как отношения спектров ВВПВ к спектрам ВСР соответствующих мод и далее аппроксимировались 4-х-параметрическими сигмоидальными функциями.

Предварительная обработка и анализ сигналов, а также статистическая обработка результатов были проведены в среде Matlab R2016a (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA). Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для проверки возможного влияния регуляторных процессов на усредненный по времени периферический пульс мы проанализировали и сравнили центральные и периферические кардиоритмограммы. Было обнаружено, что усредненные по времени и по группе испытуемых периоды центрального и периферического пульсов не различались между собой и были равны 0.83 ± 0.03 с ($p > 0.8$). Также не различались их девиации и коэффициенты вариации (данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка). Последние находились в диапазоне 5–10%. Полученные данные подтверждают результаты многочисленных ранее проведенных исследований о том, что усредненный по времени периферический сердечный ритм определяется центральным механизмом и не зависит от возможных локальных динамических изменений параметров сосудистого русла. Усредненное за 7-минутный интервал ВППВ составило в среднем по группе 0.160 ± 0.003 с, а средний коэффициент вариации был около 5% (данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка).

Усредненные показатели не позволяют оценить динамические изменения сердечного ритма и пульсовой волны, формирующей периферический ритм. Оценка динамических свойств пульсовой волны может показать, влияют ли процессы, регулирующие тонус сосудов, на временную задержку между периферическим и центральным пульсом, а следовательно, и на скорость распространения пульсовой волны. Также, используя спектры ВСР, можно оценить связь между ВВПВ и ВСР.

Результаты спектрального анализа показаны на рис. 1. Было обнаружено и проанализировано 3 первые эмпирические моды для ВСР (рис. 1а–1в) и для ВВПВ (рис. 1г–1е). Усредненные по группе амплитуды колебаний 1, 2, и 3 мод были 7.3 ± 1.1 мс, 18.5 ± 1.5 мс и 12.6 ± 1.1 мс для ВСР и 2.0 ± 0.1 мс, 2.2 ± 0.4 мс и 1.7 ± 0.3 мс для ВВПВ соответственно (данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка). Видно, что для ВВПВ значения амплитуд в разы меньше, чем для ВСР. При этом для всех мод положение максимумов спектров ВВПВ было значимо сдвинуто в сторону более высоких частот по сравнению со спектрами ВСР.

Несмотря на количественные различия, наблюдается качественное сходство между спектрами ВВПВ и ВСР как по количеству мод, так и по характеру их спектральных кривых (рис. 1). Это может свидетельствовать о наличии функциональной взаимосвязи между ними. Для оценки такой взаимосвязи мы вычислили отношение амплитуд спектров ВВПВ к ВСР и получили частотные зависимости этих отношений (рис. 1ж–1и). Эти зависимости хорошо аппроксимировались сигмоидальными функциями

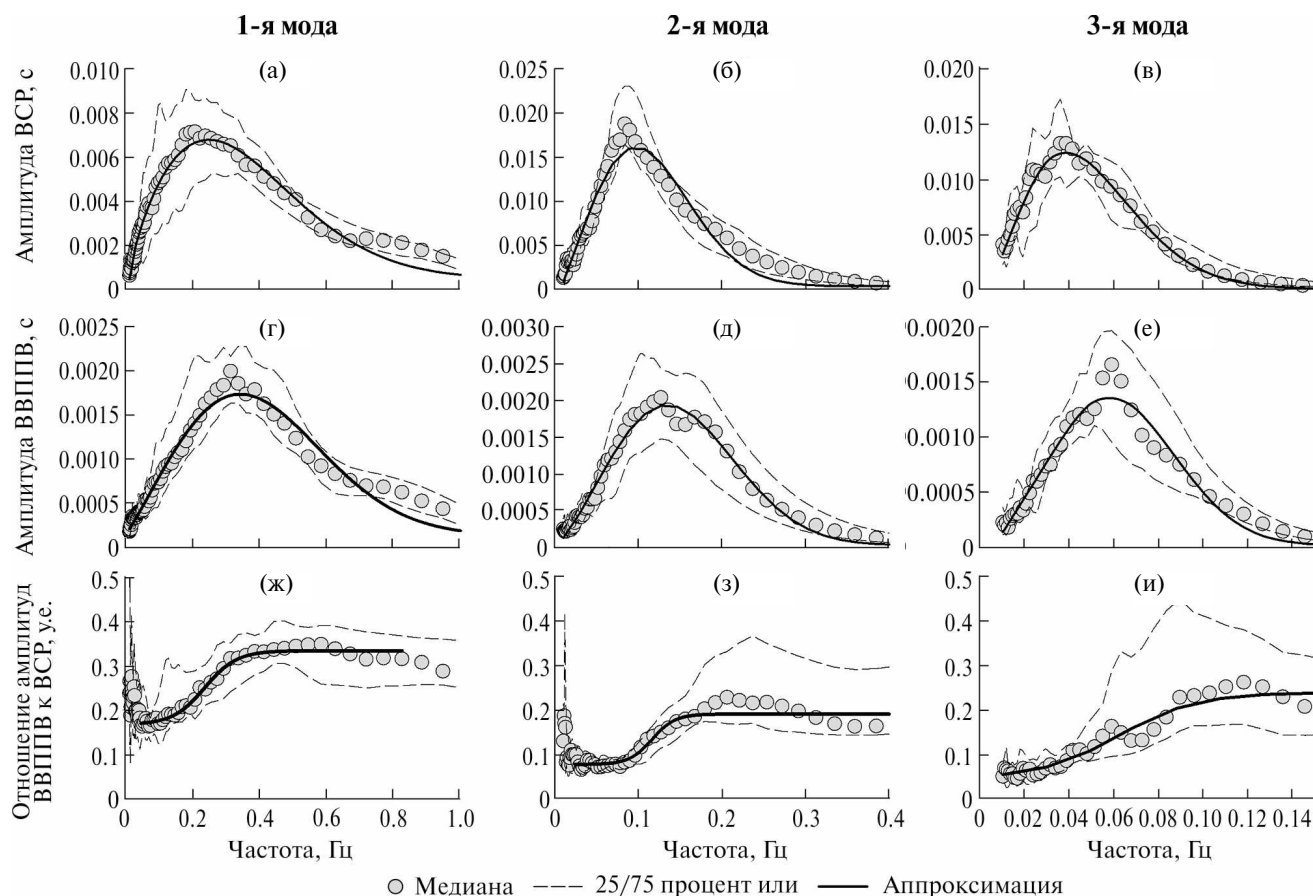


Рис. 1. Спектры эмпирических мод для ВСР (а, б, в) и ВВПВ (г, д, е) и их отношения (ж, з, и). Точки — медианы; пунктирные кривые — 25 и 75 проценти; жирные сплошные кривые — аппроксимации функциями Вейбулла (а–е) и 4-х-параметрическими сигмоидальными функциями (ж–и).

с коэффициентом детерминации $R^2 > 0.95$. Из рисунка видно, что для 1, 2 и 3 мод точки перегиба сигмоидальных зависимостей сдвигаются в область низких частот: 0.24 Гц, 0.12 Гц и 0.06 Гц соответственно, а значения пьедестала снижаются: 0.17, 0.08 и 0.04 соответственно. Полученные функциональные связи между ВВПВ и ВСР могут отражать суммарный результат всех воздействий, дающих вклад в динамическое нелинейное изменение фазы колебаний скорости распространения пульсовой волны.

В результате выполнения пилотного исследования обнаружена новая закономерность динамики прохождения пульсовой волны от сердца к мягким тканям дистальных участков конечностей условно здоровых испытуемых. Она проявляется как частотно-зависимый феномен периодических изменений фазы колебаний скорости распространения пульсовой волны, который, возможно, отражает суммарный вклад всех эпизодических воздействий на скорость распространения пульсовой волны от сердца к мягким тканям. Важно подчеркнуть, что

эпизодические изменения скорости распространения пульсовой волны не могут значительно повлиять на ее усредненную скорость. Частотно-зависимый феномен фазовой модуляции периодических изменений времени прохождения пульсовой волны является не альтернативным методом оценки состояния ССС, но принципиально новым дополнением к нейрогуморальным механизмам регуляции динамики кровоснабжения органов и тканей в норме и при заболеваниях. Исследование участия этого комплекса механизмов в формировании и течении патологий различной этиологии может быть полезным при их профилактике и лечении.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят академика В. Н. Шабалина за конструктивное обсуждение вариантов рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Финансирование работы проводилось в рамках выполнения работ по госзаданиям ИБК РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе не проводились исследования человека и животных. Проводился анализ данных из открытой базы данных Pulse Transit Time PPG Dataset (version 1.1.0) [9]. По данным используемой базы данных все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней, и все участники дали письменное информированное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heart Rate Variability. Standards of Measurement, Physiological Interpretation, and Clinical Use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology // *Circulation*. 1996. V. 93. P. 1043–1065.
2. *Mattace-Raso F.U.S., Hofman A., Verwoert G.C., et al.* Determinants of Pulse Wave Velocity in Healthy People and in the Presence of Cardiovascular Risk Factors: “Establishing Normal and Reference Values” // *Eur. Heart J.* 2010. V. 31. P. 2338–2350.
3. *Mejía-Mejía E., May J.M., Torres R., et al.* Pulse Rate Variability in Cardiovascular Health: A Review on its Applications and Relationship with Heart Rate Variability // *Physiol. Meas.* 2020. V. 41. P. 07TR01.
4. *Котовская Ю.В., Рогоза А.Н., Орлова Я.А. и др.* Амбулаторное мониторирование пульсовых волн: статус проблемы и перспективы. Позиция российских экспертов // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2018. Т. 17. С. 95–109.
5. *Leloup A.J.A., Van Hove C.E., De Moudt S., et al.* Vascular Smooth Muscle Cell Contraction and Relaxation in the Isolated Aorta: A Critical Regulator of Large Artery Compliance // *Physiol. Rep.* 2019. V. 7(4). P. e13934.
6. *Yuda E., Shibata M., Ogata Y., et al.* Pulse Rate Variability: A New Biomarker, not a Surrogate for Heart Rate Variability // *J. Physiol. Anthropol.* 2020. V. 39. P. 21.
7. *Гриневиц А.А., Чемерис Н.К.* Спектральный анализ variability сердечного ритма на основе метода Гильберта–Хуанга // *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни*. 2023. Т. 511. С. 395–398.
8. *Гриневиц А.А., Гарамян Б.Г., Чемерис Н.К.* Локализация механизмов амплитудно-частотной модуляции пульсового кровенаполнения микрососудистого русла мягких тканей. Пилотное исследование // *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни*. 2022. Т. 504. С. 223–228.
9. *Mehrgardt P., Khushi M., Poon S., et al.* Pulse Transit Time PPG Dataset (version 1.1.0). 2022. PhysioNet.
10. *Goldberger A., Amaral L., Glass L., et al.* PhysioBank, PhysioToolkit, and PhysioNet: Components of a new research resource for complex physiologic signals // *Circulation [Online]*. 2000. V. 101(23). P. e215–e220.
11. *Park J., Seok H.S., Kim S.-S., et al.* Photoplethysmogram Analysis and Applications: An Integrative Review // *Front. Physiol.* 2022. V. 12. P. 808451.
12. *Huang N.E., Zheng S., Steven R.L., et al.* The Empirical Mode Decomposition and the Hilbert Spectrum for Nonlinear and Non-stationary Time Series Analysis // *Proceedings of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 1998. V. 454. P. 903–995.
13. *Тычков А.Ю.* Применение модифицированного преобразования Гильберта–Хуанга для решения задач цифровой обработки медицинских сигналов // *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Технические науки*. 2018. Т. 3. С. 70–82.

FREQUENCY-DEPENDENT VARIABILITY OF PULSE WAVE TRANSIT TIME. PILOT STUDY

A. A. Grinevich^{a,*} and N. K. Chemeris^{a,**}

^a*Institute of Cell Biophysics of Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation*

^{*}*e-mail: grin_aa@mail.ru*

^{**}*e-mail: nikolai.chemeris@mail.ru*

Recommended by Academician of the RAS V.N. Shabalin

The dynamics of the pulse wave (PW) associated with the PW transit time variability (PWTTV) determines the peripheral pulse rate variability, which is used as a surrogate for heart rate variability (HRV). The aim of the work is to analyze the frequency-dependent dynamics of PWTTV and to identify the possible frequency-phase modulation of PW velocity oscillations on the transit from the heart to the soft tissues of the distal parts of the upper extremities. RR-interval recordings and synchronous records of photoplethysmograms of 12 conditionally healthy subjects from the PhysioNet open database were used in this work. Using the Hilbert–Huang transform 3 spectral components of PWTTV and HRV were identified. It was shown that the amplitudes of PWTTV oscillations were many times (up to 8.4 times) smaller than the amplitudes of HRV, and the peaks of PWTTV spectral components were shifted towards higher frequencies than those of HRV. Functional relations between PWTTV and HRV, which can determine the phase modulation of periodic changes in the velocity of propagation of PW, were revealed.

Keywords: cardiovascular system, pulse wave transit time, Hilbert–Huang method, wavelet analysis

УДК 620.3

БИНАРНАЯ ПРОТОННАЯ ТЕРАПИЯ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АДРЕСНЫХ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА

© 2024 г. М. В. Филимонова^{1,2}, Д. Д. Колманович^{3,4}, Г. В. Тихоновский⁵,
Д. С. Петруня^{4,5,*}, П. А. Котельникова⁶, А. А. Шитова¹, О. В. Солдатова¹,
А. С. Филимонов¹, В. А. Рыбачук¹, А. О. Косаченко¹, К. А. Николаев¹,
Г. А. Демяшкин¹, А. А. Попов⁵, М. С. Савинов⁵, А. Л. Попов^{3,4}, И. В. Зелепукин⁶,
А. А. Липенголыц^{5,7}, К. Е. Шпакова^{5,7}, А. В. Кабашинов⁸, С. Н. Корякин^{1,2},
академик РАН С. М. Деев⁶, И. Н. Завестовская^{4,5}

Поступило 25.01.2024 г.

После доработки 15.02.2024 г.

Принято к публикации 20.02.2024 г.

Протонная терапия способна осуществлять лечение опухолей, расположенных в чувствительных к излучению тканях. Данная статья демонстрирует фундаментальную возможность усиления эффекта протонной терапии с использованием адресных наночастиц золота, селективно распознающих опухолевые клетки. Наночастицы Au-PEG в концентрации выше 25 мг/л и дозе протонов 4 Гр вызвали полную гибель клеток ЕМТ6/Р *in vitro*. Также, бинарная протонная терапия с использованием наночастиц золота Au-PEG-FA, векторизованных фолиевой кислотой, вызвала 80% эффект торможения роста опухоли *in vivo*. Использование адресных наночастиц золота является перспективным для усиления протонного воздействия на опухолевые клетки и требует дальнейших исследований для повышения терапевтического индекса подхода.

Ключевые слова: протонная терапия, радиосенсибилизаторы, наночастицы, золото, терапия опухолей

DOI: 10.31857/S2686738924030104, **EDN:** VTOKHA

ВВЕДЕНИЕ

Протонная лучевая терапия является перспективным направлением в радиационной онкологии. Основными преимуществами протонной терапии является высвобождение большей части энергии протонов на конце их пути в пике Брэгга и прямолинейность траектории движения частиц в тканях человека [1]. Это выгодно отличает подход от фотонной лучевой терапии, в которой максимум радиоактивной дозы поглощается в начале пути в ткани. Бинарные подходы к протонной терапии с использованием наночастиц в качестве сенсибилизаторов способны повысить токсические эффекты за счет физических эффектов усиления дозы, а также биологических эффектов образования активных форм кислорода и радикалов [2, 3]. В частности, было показано, что облучение протонами наночастиц из элементов с высоким атомным номером (Z), таких как Au и Pt, вызывает высвобождение вторичных и оже-электронов и образование гидроксил-радикалов в растворе [4]. С другой стороны, даже легкие элементы, такие как бор [5] и титан [6], были способны усилить протонную терапию за счет каталитических процессов, происходящих на поверхности частиц.

¹Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия

²Обнинский институт атомной энергетики — филиал ФГАОУ ВО Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ», Обнинск, Россия

³ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

⁴ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Москва, Россия

⁵ФГАОУ ВО Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия

⁶ФГБУН Институт биорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

⁷ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

⁸Aix-Marseille University, Марсель, Франция

*e-mail: d.petrunya@lebedev.ru

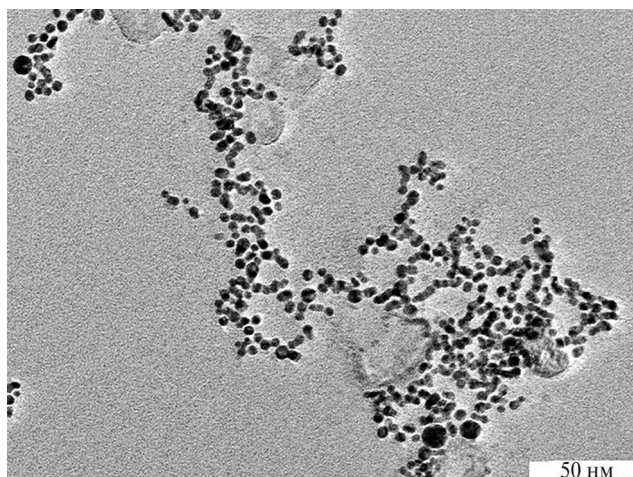


Рис. 1. Изображение наночастиц Au, полученное с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

Тем не менее, доставка наночастиц в опухолевую ткань перед лучевой терапией является самостоятельной сложной задачей. Активно делящиеся опухолевые клетки локализованы в большинстве случаев на периферии опухоли, а также рядом с кровеносными сосудами. В силу этого, внутриопухолевое введение частиц оказывается малоэффективным, так как их диффузия ограничена связыванием с межклеточным матриксом [7]. При использовании внутривенного введения требуется наличие нацеливающих векторов, способных селективно распознавать периферию опухолевой ткани и при связывании длительно задерживать наночастицы в ткани-мишени [8]. Современные работы по созданию нацеленных частиц для протонной терапии ограничены *in vitro* уровнем [9, 10], хотя и демонстрируют высокую селективность осуществляемого воздействия.

Одной из перспективных мишеней для нацеливания является FR α изоформа фолатного рецептора. Данный белок представлен при большом количестве раковых заболеваний эпителиального происхождения, включая рак молочной железы, легких, почек и яичников [11] с уровнем экспрессии 1–10 миллионов белков на клетку, что в 100–300 раз выше, чем у здоровых тканей. В данной работе предложен фундаментальный подход к бинарной протонной терапии с использованием таргетных наночастиц золота, нацеленных на фолатный рецептор с использованием альбумина, конъюгированного с фолиевой кислотой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для демонстрации описанного подхода были получены наночастицы элементного золота методом импульсной лазерной абляции [12] в 1 mM водно-

го раствора NaCl. При облучении золотой мишени с помощью фемтосекундного Yb: KGW лазера (ТЕТА-10, длина волны 1030 нм, длительность импульса 270 фс, энергия импульса 50 мкДж, частота 200 кГц) образовывались наночастицы с размером менее 100 нм. Для *in vitro* и *in vivo* экспериментов наночастицы с размером менее 20 нм выделялись методом центрифугирования. В результате были получены сферические частицы с размером от 4 до 8 нм, что было подтверждено просвечивающей электронной микроскопией (рис. 1). Полученные наночастицы покрывались полиэтиленгликолем (5 кДа) с концевой тиольной группой за счет образования ковалентной Au-S связи [13], что обеспечивало им долговременную коллоидную стабильность в фосфатно-солевом буфере как минимум в течение 24 часов.

Для оценки возможности усиления протонной терапии с использованием полученных наночастиц цитотоксичность бинарного подхода была изучена на клетках карциномы молочной железы мыши (линия ЕМТ6/Р). Наночастицы золота вносились к клеткам и соинкубировались с ними в течение 16 часов, после чего производилось облучение клеток на комплексе протонной терапии “Прометеус” (Протвино, Россия). Энергия протонов в пучке составила 160.5 МэВ, и монослой клеток располагался в положении распределенного пика Брэгга. Гомогенность пучка составляла не менее 98% при уровне изодозы 95%. Оценка количества колоний с размером более 50 клеток через 8 дней после облучения показала существенное снижение клоногенной активности при бинарной терапии (рис. 2).

Важно отметить, что наночастицы Au-PEG в исследуемом диапазоне концентраций (от 10 до 50 мкг/мл) не вызывали снижение числа образовавшихся колоний клеток, что подтверждает их высокую биосовместимость. В то же время клетки демонстрировали дозозависимый ответ на облучение пучком протонов, что выражалось в снижении количества образующихся колоний на 25 и 50% для доз 2 и 4 Гр соответственно. Преинкубирование клеток с наночастицами Au-PEG в концентрации 50 мкг/мл с совместным облучением в дозе 2 Гр приводило к четырехкратному снижению числа колоний по сравнению с необлученной группой (рис. 2). Также преинкубирование клеток с наночастицами в концентрациях 25 мкг/мл и 50 мкг/мл и облучении в дозе 4 Гр приводило к полному исчезновению раковых колоний. Таким образом, наночастицы Au-PEG проявляли высокую биосовместимость и радиосенсибилизирующее действие при облучении пучком протонов в дозе 2–4 Гр *in vitro*.

Затем радиосенсибилизирующие свойства золота были исследованы *in vivo*. В качестве модели опухоли была выбрана солидная карцинома Эрлиха. Данные клетки гиперэкспрессируют фолатный рецептор

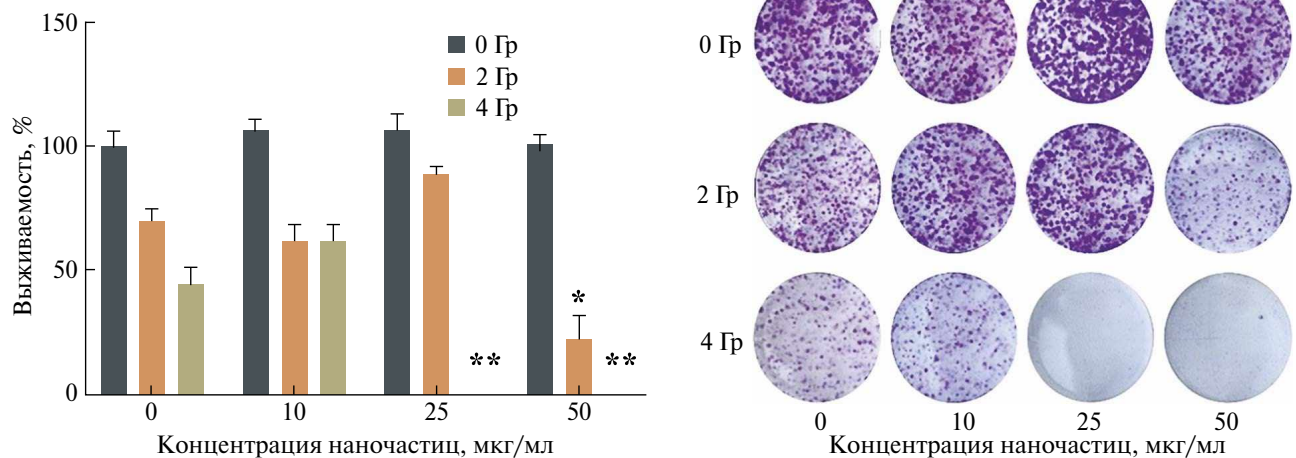


Рис. 2. Клоногенный анализ клеток аденокарциномы EMT6/P после облучения протонным пучком в присутствии наночастиц Au-PEG. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.001$, тест Стьюдента.

альфа [14], поэтому существовала возможность осуществлять нацеливание внутривенно вводимых наночастиц с помощью таргетного модуля на основе фолиевой кислоты. Для демонстрации данного принципа нами были получены конъюгаты наночастиц Au-PEG с фолиевой кислотой, используя бычий сывороточный альбумин (БСА) в качестве промежуточного линкера (далее – Au-PEG-FA). Конъюгат с БСА получали методом карбодиимидной химии. Присоединение конъюгата к наночастицам было обусловлено образованием связи между SH-группами в альбумине и свободной поверхностью золотых НЧ. Эффективность прикрепления фолиевой кислоты к наночастицам было подтверждено UV–Vis оптической спектроскопией по интенсивности характерного пика поглощения фолиевой кислоты (363 нм) [15].

Клетки карциномы Эрлиха вводились самкам мышей F1 (СВА × C57BL6j) (возраст 8–10 недель, масса тела 22–24 г) подкожно в область латеральной поверхности правого бедра, и через 10 дней производилось облучение правого бедра протонным пучком с помощью комплекса «Прометеус», доза облучения составила 31 Гр. Для оценки бинарной терапии одной группе мышей за 24 часа до облучения вводили внутривенно в 0.2 мл PBS 20 мг наночастиц Au-PEG-FA с фолиевой кислотой на поверхности. Накопление наночастиц в опухолевом узле оценивали с помощью компьютерной томографии. Критерием наличия наночастиц в определенной области считали повышение рентгеноплотности по сравнению с нативными срезами (в мягкой ткани до введения наночастиц ~110–130 НУ). После внутривенной инъекции наночастиц по данным КТ определялось неомогенное повышение рентгеноплотности ткани опухоли до ~210–240 НУ в виде мелких множественных гипер-

денсивных включений, распределенных неравномерно по всему объему опухоли. Наиболее интенсивное контрастирование отмечалось в перитуморальной строме опухолевого узла, где ожидаемо находится наибольшее количество живых опухолевых клеток. Эти данные могут свидетельствовать об эффективности конъюгата с фолиевой кислотой в качестве опухолеспецифического вектора для солидной карциномы Эрлиха.

Динамику развития карциномы Эрлиха в экспериментальных группах оценивали морфометрически. Для этого через каждые 2–3 дня наблюдения проводили измерение линейных размеров опухолевых узлов у всех животных с помощью цифрового штангенциркуля ШЦЦ-1-125 (НПП ЧИЗ, РФ). Расчет объемов опухолевых узлов и индекса торможения роста опухоли (ТРО) на этапах наблюдения проводили по методике, ранее описанной в работе [16].

Использование наночастиц Au-PEG-FA в качестве радиосенсибилизатора при проведении протонной лучевой терапии значительно усиливало биологический ответ карциномы Эрлиха *in vivo*. При однократном локальном облучении протонами в дозе 31 Гр отмечалось выраженное торможение роста опухоли (ТРО = 55–60%). В то же время предварительное внутривенное введение наночастиц статистически значимо усиливало торможение роста опухоли на 15–25% на протяжении всего периода наблюдений, при этом показатель ТРО достигал 80% (рис. 3). При этом токсического (летального) действия протонной и бинарной терапии в опыте не наблюдалось.

Эффект радиосенсибилизации также был подтвержден сравнительным анализом массы опухолевых узлов, выделенных на терминальном этапе опыта,

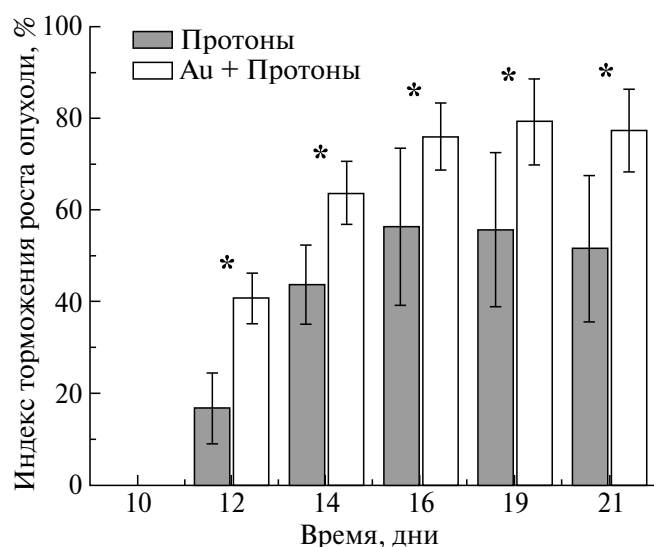


Рис. 3. Показатели индекса торможения роста (ТРО) карциномы Эрлиха после воздействия протонами в дозе 31 Гр в присутствии и отсутствии наночастиц Au-PEG-FA. * — $p < 0.05$, тест Крускала–Уоллиса.

где у мышей после бинарной терапии наблюдалась 2,2-кратно меньшая масса опухоли в сравнении с мышами без терапии и в 1,25 раз меньшая, чем у мышей, получавших только протонную терапию. В данном исследовании была проведена эвтаназия всех животных для терминального макроскопического исследования опухолевых узлов.

Таким образом, в данном исследовании мы показали перспективность использования адресных наночастиц золота, нацеленных на фолатный рецептор опухоли, в качестве сенситизаторов протонной терапии. Наночастицы вызвали полное ингибирование клоногенной активности аденокарциномы EMT6/P *in vitro* при концентрациях выше 25 мкг/мл и радиодозе 4 Гр. Также, предварительные результаты терапии показали существенное дополнительное замедление роста опухоли при бинарном воздействии наночастиц и протонов. Бинарная терапия с использованием адресных наночастиц золота требует дальнейшего изучения для определения токсичности подхода, детального определения биораспределения частиц и долговременных эффектов лечения опухолей.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была поддержана грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, № 075-15-2021-1347.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Протоколы с использованием животных были одобрены Комиссией по биоэтическому контролю за со-

держанием и использованием лабораторных животных в научных целях ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (номер заявки 1-Н-00053 от 12.09.2023).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Durante M., Loeffler J.S. Charged Particles in Radiation Oncology // Nat. Rev. Clin. Oncol. 2010. V. 7(1). P. 37–43. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.183>
2. Lo C.Y., Tsai S.W., Niu H., et al. Gold-nanoparticles-enhanced Production of Reactive Oxygen Species in Cells at Spread-out Bragg Peak under Proton Beam Radiation // ACS Omega. 2023. V. 8(20). P. 17922–17931.
3. Martínez-Rovira I., Prezado Y. Evaluation of the Local Dose Enhancement in the Combination of Proton Therapy and Nanoparticles // Med. Phys. 2015. V. 42(11). P. 6703–6710.
4. Zwiehoff S., Johnny J., Behrends C., et al. Enhancement of Proton Therapy Efficiency by Noble Metal Nanoparticles is Driven by the Number and Chemical Activity of Surface Atoms // Small. 2022. V. 18(9). P. e2106383.
5. Zavestovskaya I.N., Popov A.L., Kolmanovich D.D., et al. Boron Nanoparticle-enhanced Proton Therapy for Cancer Treatment // Nanomaterials (Basel). 2023. V. 13(15). P. 2167.
6. Gerken L.R.H., Gogos A., Starsich F.H.L., et al. Catalytic Activity Imperative for Nanoparticle Dose Enhancement in Photon and Proton Therapy // Nat. Commun. 2022. V. 13(1). 3248.
7. Zelepukin I.V., Griaznova O.Yu., Shevchenko K.G., et al. Flash Drug Release from Nanoparticles Accumulated in the Targeted Blood Vessels facilitates the Tumour Treatment // Nat. Commun. 2022. V. 13(1). 6910.
8. Tolmachev V.M., Chernov V.I., Deyev S.M. Targeted Nuclear Medicine. Seek and Destroy // Russ. Chem. Rev. 2022. V. 91(3). RCR5034.
9. Li S., Bouchy S., Penninckx S., Marega R., et al. Antibody-functionalized Gold Nanoparticles as Tumor Targeting Radiosensitizers for Proton Therapy // Nanomedicine. 2019. V. 14(3). P. 317–333.
10. Kang S.H., Hong S.P., Kang B.S. Targeting Chemo-proton Therapy on C6 Cell Line Using Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Conjugated with Folate and Paclitaxel // International Journal of Radiation Biology. 2018. V. 94(11). P. 1006–1016.
11. Siwowska K., Haller S., Bortoli F., et al. Preclinical Comparison of Albumin-binding Radiofolates: Impact of Linker Entities on the in Vitro and in Vivo Properties // Mol. Pharm. 2017. V. 14(2). P. 523–532.
12. Popov A.A., Swiatkowska-Warkocka Z., Marszałek M., et al. Laser-ablative Synthesis of Ultrapure Magneto-plasmonic Core-satellite Nanocomposites for Biomedical Applications // Nanomaterials (Basel). 2022. V. 12(4). 649.
13. Gao J., Huang X., Liu H., Zan F., Ren J. Colloidal Stability of Gold Nanoparticles Modified with Thiol Compounds: Bioconjugation and Application in Cancer Cell Imaging // Langmuir. 2012. V. 28(9). P. 4464–4471.
14. R.S., M Joseph M., Sen A., K R.P., Bs U., Tt S. Galactomannan Armed Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as

- a Folate Receptor Targeted Multi-functional Theranostic Agent in the Management of Cancer // *Int. J. Biol. Macromol.* 2022. V. 219. P. 740–753.
15. Baibarac M., Smaranda I., Nila A., Serbschi C. Optical Properties of Folic Acid in Phosphate Buffer Solutions: The Influence of pH and UV Irradiation on the UV–VIS Absorption Spectra and Photoluminescence // *Sci. Rep.* 2019. V. 9(1). 14278.
16. Filimonova M., Shitova A., Soldatova O., et al. Combination of NOS- and PDK-Inhibitory Activity: Possible Way to Enhance Antitumor Effects // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. 730.

BINARY PROTON THERAPY OF EHRlich CARCINOMA USING TARGETED GOLD NANOPARTICLES

M. V. Filimonova^{a,b}, D. D. Kolmanovich^{c,d}, G. V. Tikhonowski^e, D. S. Petrunya^{d,e,#}, P. A. Kotelnikova^f, A. A. Shitova^a, O. V. Soldatova^a, A. S. Filimonov^a, V. A. Rybachuk^a, A. O. Kosachenko^a, K. A. Nikolaev^a, G. A. Demyashkin^a, A. A. Popov^e, M. S. Savinov^e, A. L. Popov^{c,d}, I. V. Zelepukin^f, A. A. Lipengolts^{e,g}, K. E. Shpakova^{e,g}, A. V. Kabashin^h, S. N. Koryakin^{a,b}, Academician of the RAS S. M. Deyev^f, and I. N. Zavestovskaya^{d,e}

^a A. Tsyb Medical Radiological Research Centre — Branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation

^b Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering — Branch of the National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Obninsk, Russian Federation

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

^d P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

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

^f Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^g Federal State Budgetary Institution N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

^h Aix-Marseille University, CNRS, Marseille, France

[#] e-mail: d.petrunya@lebedev.ru

Proton therapy can treat tumors located in radiation-sensitive tissues. This article demonstrates the possibility of enhancing the proton therapy with targeted gold nanoparticles that selectively recognize tumor cells. Au-PEG nanoparticles at concentrations above 25 mg/L and 4 Gy proton dose caused complete death of EMT6/P cells *in vitro*. Binary proton therapy using targeted Au-PEG-FA nanoparticles caused an 80% tumor growth inhibition effect *in vivo*. The use of targeted gold nanoparticles is promising for enhancing the proton irradiation effect on tumor cells and requires further research to increase the therapeutic index of the approach.

Keywords: proton therapy, radiosensitizers, nanoparticles, gold, tumour therapy

УДК 571.27

ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИГЕННЫЙ ЭПИТОП И ТИОРЕДОКСИН ДЛЯ *IN VITRO* СТИМУЛЯЦИИ CD4⁺ TCR⁺ JURKAT T-КЛЕТОК

© 2024 г. И. А. Ишина^{1,*}, М. Ю. Захарова^{1,**}, И. Н. Курбачкая¹,
А. Э. Мамедов¹, А. А. Белогуров^{1,2}, Ю. П. Рубцов¹, академик РАН А. Г. Габитов^{1,3,4}

Поступило 02.03.2024 г.

После доработки 10.03.2024 г.

Принято к публикации 15.03.2024 г.

Исследование CD4⁺ Т-клеточного ответа, а также специфичности Т-клеточных рецепторов (TCR) имеет ключевое значение для изучения этиологии иммунных заболеваний и разработки их целевой терапии. Растворимость, доступность и стабильность синтетических антигенных пептидов, используемых при оценке специфичности Т-клеток, имеют критическую важность. В данной работе мы используем репортерную систему активации Т-клеток с использованием рекомбинантных белков, содержащих антигенные эпитопы, слитые с бактериальным тиоредаксином (trx-пептидами), полученных с помощью бактериальной экспрессии. Совместная инкубация CD4⁺ HA1.7 TCR⁺ репортерных клеток Jurkat 76 TRP с CD80⁺ HLA-DRB1*01:01⁺ клетками HeLa или CD4⁺ Ob.1A12 TCR⁺ Jurkat 76 TRP с CD80⁺ HLA-DRB1*15:01⁺ клетками HeLa приводит к активации Jurkat 76 TPR при добавлении trx-пептидов, содержащих TCR-специфичные эпитопы. Trx-пептиды проявили сопоставимый потенциал активации Jurkat 76 TPR в сравнении с синтетическими пептидами. Полученные данные демонстрируют, что тиоредаксин (trx) в качестве белка-носителя оказывает минимальное влияние на распознавание TCR и последующую активацию Т-клеток. Наши результаты подчеркивают потенциальную возможность использования trx-пептидов в качестве реагента для оценки иммуногенности антигенных фрагментов.

Ключевые слова: МНС-II, презентация антигенов, Jurkat 76 TPR, CD80⁺ HeLa

DOI: 10.31857/S2686738924030119, **EDN:** VTFRUM

CD4⁺ Т-клетки играют основную роль в регуляции иммунного ответа. Активация CD4⁺ Т-клеток зависит от узнавания антигенных пептидов, представленных в комплексах с молекулами главного комплекса гистосовместимости II класса (МНС-II) (рМНС), которые экспонируются на антигенпрезентирующих клетках (АПК) [1–3]. Необходимо тестирование множества потенциальных антигенных мишеней для точного определения иммуногенных эпитопов.

Природные АПК, включающие В-клетки, дендритные клетки и макрофаги, не только экспрессируют молекулы МНС-II, но также обеспечивают костимулирующие сигналы (например, посредством CD80, CD86), необходимые для оптимальной активации CD4⁺ Т-клеток. Тем не менее, использование природных АПК сопряжено с различными проблемами из-за их ограниченной доступности. Существуют вычислительные методы прогнозирования иммуногенных эпитопов, однако эти алгоритмы в идеале требуют экспериментальной проверки [4, 5]. Искусственные АПК были разработаны как альтернативный подход к стимуляции CD4⁺ Т-клеток. Например, в качестве АПК можно использовать эритролейкозные клетки человека K562 или клеточные линии фибробластов мыши NIH/3T3, экспрессирующие как костимулирующие молекулы, так и HLA-DR [6, 7]. В настоящей работе мы определили эффективность trx-пептидов, полученных в прокариотической системе экспрессии, для связывания и активации антиген-специфичных клеток CD4⁺ Jurkat 76 TPR.

Мы использовали линию клеток HeLa, в которой отсутствует эндогенная экспрессия молекул

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

²Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия

³Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, Россия

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: ishina.irina.a@gmail.com

**e-mail: mariya.zakharova333@gmail.com

МНС-II, тем самым предотвращая перекрестную презентацию антигенных пептидов. Ранее созданную клеточную линию CD80⁺ HeLa [8] трансдуцировали лентивирусами, кодирующими HLA-DRB1*01:01 и HLA-DRB1*15:01. Лентивирусы собирали через 48 часов после котрансфекции клеток НЕК 293Т конструкциями, содержащими кодирующую последовательность β/α-цепей МНС-II, разделенных пептидом 2А (Т2А), и упаковывающими плазмидами. В качестве CD4⁺ Т-клеток использовали ранее разработанные клеточные линии — CD4⁺ HA1.7 TCR⁺ и CD4⁺ Ob.1A12 TCR⁺ Jurkat 76 TPR [8], полученные путем последовательной трансдукции CD4⁺ и TCR-кодирующими лентивирусами клеточной линии Jurkat 76 TPR [8, 9]. TCR HA1.7 специфичен к фрагменту гемагглютинина А гриппа (HA_{306–318}) в комплексе с HLA-DRB1*01:01 и обладает высокой аффинностью к рМНС [10]. TCR Ob.1A12 специфичен к фрагменту основного белка миеллина (MBP) (MBP_{85–99}) в комплексе с HLA-DRB1*15:01 и имеет низкую аффинность к рМНС благодаря аутоиммунному происхождению [11]. В клетках Jurkat 76 TPR отсутствует эндогенный αβ TCR, что снижает риск неправильного спаривания цепей TCR. Кроме того, эти клетки экспрессируют NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток)-зависимый флуоресцентный репортер GFP при стимуляции TCR или химерного антигенного рецептора (CAR), что можно легко оценить с помощью проточной цитометрии. В совокупности совместное культивирование клеток CD80⁺ HLA-DRB1⁺ HeLa и клеточных линий CD4⁺ TCR⁺ Jurkat 76 TPR представляет удобную платформу для оценки иммуногенности антигенных пептидов.

Высокополиморфные молекулы МНС-II имеют открытую борозду связывания пептидов, вмещающую длинные пептиды и даже белки, в отличие от МНС-I. Твердофазный синтез пептидов в случае

относительно длинных молекул является дорогостоящим и труднодоступным. Чтобы решить эту проблему, мы использовали слитые пептиды, которые можно производить в *E. coli* в больших количествах с низкими затратами. Ранее мы продемонстрировали, что белок-носитель trх способствует связыванию пептидных эпитопов с сывороточными аутоантителами пациентов с рассеянным склерозом [12]. Кроме того, trх увеличивает выход экспрессии, улучшает растворимость и стабильность антигенных пептидов, что может быть критическим моментом для синтетических аналогов. Мы использовали ранее опубликованные конструкции, содержащие пептид (HA_{306–318} (PKYVKQNTLKLAT) или MBP_{81–104} (QDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQG)), связанный через серин-глициновый линкер с С-концом бактериального trх, меченного кластером 6xHis [13]. Конструкция, содержащая только trх-6His и серин-глициновый линкер, использовалась в качестве отрицательного контроля.

Штамм *E. coli* BL21(DE3) трансформировали ДНК, кодирующей соответствующие экспрессирующие trх-слитые конструкции, и свежетрансформированные бактерии выращивали в жидкой среде до достижения оптической плотности OD₆₀₀ = 0.6. После индукции изопропил-β-D-1-тиогалактопираниозидом (IPTG) клетки выращивали при 37 °C в течение еще 16 часов, затем лизировали. Трх-пептиды очищали с помощью аффинной хроматографии на агарозе никель-нитрилотриуксусной кислоты (Ni-NTA) (рис. 1). Чистота выделенных белков превышала 90% при анализе с помощью электрофореза SDS-PAGE. Активацию клеток CD4⁺ TCR⁺ Jurkat 76 TPR по экспрессии GFP оценивали методом проточной цитометрии. Презентацию trх-пептидов осуществляли одновременно с совместной инкубацией клеток CD80⁺ HLA-DRB1⁺ HeLa и клеток CD4⁺ TCR⁺ Jurkat

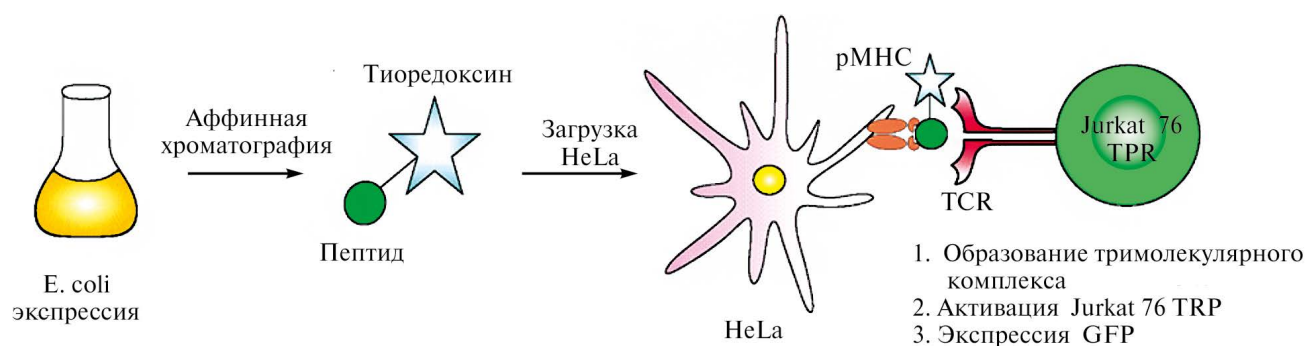


Рис. 1. Схематическое изображение использования trх-пептидов для активации CD4⁺ TCR⁺ клеток Jurkat 76 TPR. Трх-пептиды экспрессировались в *E. coli* с последующей очисткой с помощью Ni-NTA. Полученный белок загружали на HLA-DRB1*01:01 или HLA-DRB1*15:01 клеточных линий CD80⁺ HeLa и инкубировали с соответствующей клеточной линией CD4⁺ TCR⁺ Jurkat 76 TPR. Последующая активация клеточной линии CD4⁺ TCR⁺ Jurkat 76 TPR происходила за счет образования тримолекулярного комплекса и оценивалась благодаря экспрессии GFP, вызванной активацией NFAT.

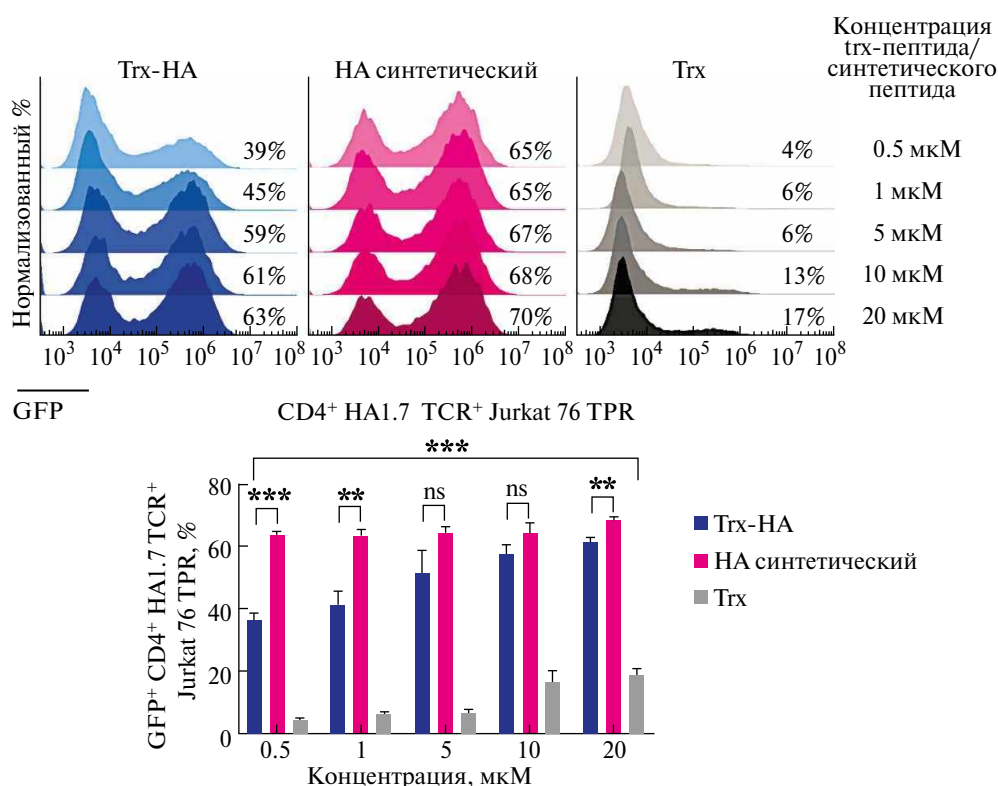


Рис. 2. Стимуляция $CD4^+$ HA1.7 $^+$ TCR Jurkat 76 TPR клетками $CD80^+$ HLA-DRB1*01:01 $^+$ HeLa, праймированными эпитопами MHC-II. $CD4^+$ HA1.7 TCR $^+$ Jurkat 76 TPR клетки инкубировали с $CD80^+$ HLA-DRB1*01:01 $^+$ HeLa в течение 16 часов с синтетическим пептидом HA или trx-HA в концентрации 0.5, 1, 5, 10 и 20 мкМ. Носитель trx использовали в качестве отрицательного контроля. Анализ проводили с помощью проточной цитометрии. Значения указывают процент активированных клеток, экспрессирующих GFP. Показаны репрезентативные профили проточной цитометрии. Процент GFP-положительных клеточных линий $CD4^+$ HA1.7 TCR $^+$ Jurkat 76 TPR, инкубированных с $CD80^+$ HLA-DRB1*01:01 $^+$ HeLa, загруженными синтетическим пептидом HA или trx-HA в концентрации 0.5, 1, 5, 10 и 20 мкМ, показан как среднее $\pm$ стандартное отклонение трех повторов эксперимента (нижний рисунок). Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Уэлча: ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

76 TPR. Примечательно, что молекулы MHC-II АПК изначально нагружены низкоаффинным пептидом CLIP, что способствует стабильности комплекса MHC-II, который впоследствии вытесняется другими экзогенными пептидами [14]. В нашей экспериментальной системе HLA-DRB1, экспонированный на HeLa, может быть загружен эндогенными пептидами с относительно высоким сродством. Однако высокие концентрации trx-пептидов эффективно вытесняют эндогенные пептиды.

$CD4^+$ HA1.7 TCR $^+$ клетки Jurkat 76 TPR (100 000 клеток на лунку) инкубировали совместно с $CD80^+$ HLA-DRB1*01:01 $^+$ клеточной линией HeLa (10 000 клеток на лунку) с различными концентрациями trx-HA (0.5, 1, 5, 10 и 20 мкМ) в течение 16 часов в 96-луночном круглодонном планшете (рис. 2). Синтетический пептид HA_{306–318} (PKYVKQNTLKLAT) служил положительным контролем. Повышение концентрации носителя trx приводило к активации клеток $CD4^+$ HA1.7 TCR $^+$ Jurkat 76 TPR. Однако процент клеток

GFP^+ $CD4^+$ HA1.7 TCR $^+$ Jurkat 76 TPR, инкубированных с 20 мкМ носителя trx, был статистически ниже, чем наблюдавшийся при инкубации с 0.5 мкМ trx-HA ($p < 0.001$). Несмотря на то, что синтетический пептид HA демонстрировал более высокий потенциал активации клеток $CD4^+$ HA1.7 TCR $^+$ Jurkat 76 TPR по сравнению с trx-HA, инкубация при концентрациях 5 и 10 мкМ не показала статистически значимой разницы между trx-пептидом и синтетическим пептидом.

При инкубации $CD4^+$ Ob.1A12 TCR $^+$ Jurkat 76 TPR с $CD80^+$ HLA-DRB1*15:01 $^+$ HeLa носитель trx практически не способствовал активации (рис. 3). Инкубация с 20 мкМ носителя trx привела к статистически менее значимому проценту популяции GFP^+ , чем инкубация с 0.5 мкМ trx-MBP_{81–104} ($p < 0.01$). Предполагается, что низкая аффинность Ob.1A12 TCR может снижать неспецифическую активацию. По аналогии с $CD4^+$ HA1.7 TCR $^+$ Jurkat 76 TPR синтетический пептид (MBP_{85–99} (ENPVVHFFKNIVTPR)) продемонстрировал большую способность активировать

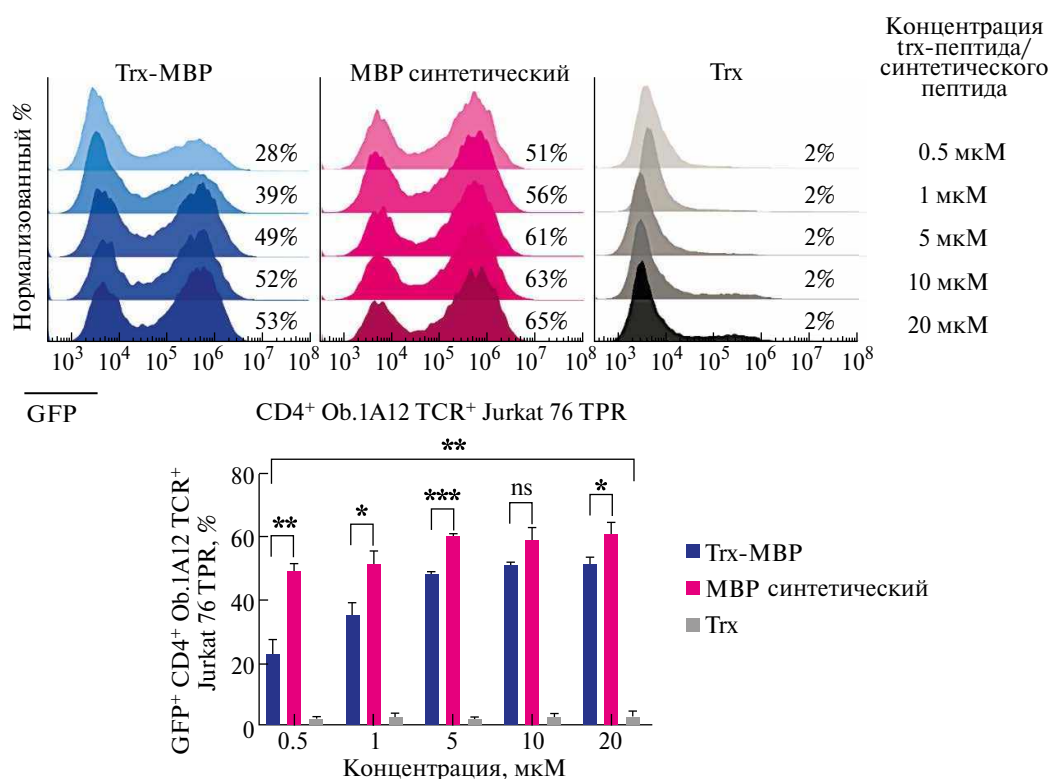


Рис. 3. Стимуляция $CD4^+$ Ob.1A12 TCR $^+$ Jurkat 76 TPR клетками $CD80^+$ HLA-DRB1*15:01 $^+$ HeLa, праймированными эпитопами МНС-II. Клетки $CD4^+$ Ob.1A12 TCR $^+$ Jurkat 76 TPR инкубировали с $CD80^+$ HLA-DRB1*15:01 $^+$ HeLa в течение 16 часов с синтетическим пептидом MBP или trx-MBP в концентрации 0.5, 1, 5, 10 и 20 мкМ. Носитель trx использовали в качестве отрицательного контроля. Анализ проводили с помощью проточной цитометрии. Значения указывают процент активированных клеток, экспрессирующих GFP. Показаны репрезентативные профили проточной цитометрии. Процент GFP-положительных клеточных линий $CD4^+$ Ob.1A12 TCR $^+$ Jurkat 76 TPR, инкубированных с $CD80^+$ HLA-DRB1*15:01 $^+$ HeLa, загруженными синтетическим пептидом MBP или trx-MBP в концентрации 0.5, 1, 5, 10 и 20 мкМ, показан как среднее $\pm$ стандартное отклонение трех экспериментальных повторов (нижний рисунок). Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Уэлча: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

клетки $CD4^+$ Ob.1A12 TCR $^+$ Jurkat 76 TPR по сравнению с trx-MBP. Инкубация с 10 мкМ синтетического или trx-пептида продемонстрировала статистически незначимую разницу в уровне активации.

В заключение наши результаты демонстрируют функциональную значимость trx-пептидов для антиген-специфического взаимодействия и стимуляции клеточных линий $CD4^+$ TCR $^+$ Jurkat 76 TPR. Разработанная методология может быть особенно полезна при анализе криптопептидов МНС-II, проблематичных с точки зрения химического синтеза, растворимости, необычной конформации и вторичной структуры.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы хотели бы поблагодарить Judith Leitner и Peter Steinberger из Венского медицинского университета (Австрия) за предоставление клеточной линии Jurkat 76 TPR.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-44-00043).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эта работа не содержит исследований с участием людей и животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pishesha N., Harmand T.J., Ploegh H.L. A Guide to Antigen Processing and Presentation // Nat. Rev. Immunol. 2022. V. 22. P. 751–764.
2. Santambrogio L. Molecular Determinants Regulating the Plasticity of the MHC Class II Immunopeptidome // Front. Immunol. 2022. V. 13.

3. *Ishina I.A., Zakharova M.Y., Kurbatskaia I.N., et al.* MHC Class II Presentation in Autoimmunity // *Cells*. 2023. V. 12.
4. *Chen B., Khodadoust M.S., Olsson N., et al.* Predicting HLA Class II Antigen Presentation through Integrated Deep Learning // *Nat. Biotechnol.* 2019. V. 37. P. 1332–1343.
5. *Racle J., Guillaume P., Schmidt J., et al.* Machine Learning Predictions of MHC-II Specificities Reveal Alternative Binding Mode of Class II Epitopes // *Immunity*. 2023. V. 56. P. 1359–1375.
6. *Butler M.O., Ansén S., Tanaka M., et al.* A Panel of Human Cell-based Artificial APC Enables the Expansion of Long-lived Antigen-specific CD4⁺ T Cells Restricted by Prevalent HLA-DR Alleles // *Int. Immunol.* 2010. V. 22. P. 863–873.
7. *Garnier A., Hamieh M., Drouet A., et al.* Artificial Antigen-presenting Cells Expressing HLA Class II Molecules as an Effective Tool for Amplifying Human Specific Memory CD4⁺ T Cells // *Immunol. Cell. Biol.* 2016. V. 94. P. 662–672.
8. *Ishina I.A., Kurbatskaia I.N., Mamedov A.E., et al.* Genetically Engineered CD80–pMHC-harboring Extracellular Vesicles for Antigen-specific CD4⁺ T-cell Engagement // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2024. V. 11.
9. *Roskopf S., Leitner J., Paster W., et al.* A Jurkat 76 Based Triple Parameter Reporter System to Evaluate TCR Functions and Adoptive T Cell Strategies // *Oncotarget*. 2018. V. 9. 17608.
10. *Hennecke J., Carfi A., Wiley D. C.* Structure of a Covalently Stabilized Complex of a Human $\alpha\beta$ T-cell Receptor, Influenza HA Peptide and MHC Class II Molecule, HLA-DR1 // *EMBO J.* 2000. V. 19. P. 5611–5624.
11. *Hahn M., Nicholson M.J., Pyrdol J., Wucherpfennig K.W.* Unconventional Topology of Self Peptide–Major Histocompatibility Complex Binding by a Human Autoimmune T Cell Receptor // *Nat. Immunol.* 2005. V. 6. P. 490–496.
12. *Belogurov A.A., Kurkova I.N., Friboulet A., et al.* Recognition and Degradation of Myelin Basic Protein Peptides by Serum Autoantibodies: Novel Biomarker for Multiple Sclerosis // *The Journal of Immunology*. 2008. V. 180. P. 1258–1267.
13. *Mamedov A., Vorobyeva N., Filimonova I., et al.* Protective Allele for Multiple Sclerosis HLA-DRB1*01:01 Provides Kinetic Discrimination of Myelin and Exogenous Antigenic Peptides // *Front. Immunol.* 2020. V. 10.
14. *Álvaro-Benito M., Freund C.* Revisiting Nonclassical HLA II Functions in Antigen Presentation: Peptide Editing and Its Modulation // *HLA*. 2020. V. 96. P. 415–429.

ANTIGENIC PEPTIDE–THIOREDOXIN FUSION CHIMERAS FOR *IN VITRO* STIMULUS OF CD4⁺ TCR⁺ JURKAT T-CELLS

**I. A. Ishina^{a, #}, M. Y. Zakharova^{a, ##}, I. N. Kurbatskaia^a, A. E. Mamedov^a,
A. A. Belogurov, Jr.^{a, b}, Y. P. Rubtsov^a, Academician of the RAS A. G. Gabibov^{a, c, d}**

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

^b*Department of Biological Chemistry, Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry,
Moscow, Russian Federation*

^c*Department of Life Sciences, Higher School of Economics, Moscow, Russian Federation*

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

[#]*e-mail: ishina.irina.a@gmail.com*

^{##}*e-mail: mariya.zakharova333@gmail.com*

Study of CD4⁺ T-cell response and T-cell receptor (TCR) specificity is crucial for understanding etiology of immune-mediated diseases and developing targeted therapies. However, solubility, accessibility, and stability of synthetic antigenic peptides used in T-cell assays may be a critical point in such studies. Here we present a T-cell activation reporter system using recombinant proteins containing antigenic epitopes fused with bacterial thioredoxin (trx-peptides) and obtained by bacterial expression. We report that co-incubation of CD4⁺ HA1.7 TCR⁺ reporter Jurkat 76 TRP-cells with CD80⁺ HLA-DRB1*01:01⁺ HeLa-cells or CD4⁺ Ob.1A12 TCR⁺ Jurkat 76 TRP with CD80⁺ HLA-DRB1*15:01⁺ HeLa-cells resulted in activation of reporter Jurkat 76 TPR after addition of recombinant trx-peptide fusion proteins, containing TCR-specific epitopes. Trx-peptides were comparable with corresponding synthetic peptides in their capacity to activate Jurkat 76 TPR. These data demonstrate that thioredoxin as a carrier protein (trx) for antigenic peptides exhibits minimal interference with recognition of MHC-specific peptides by TCRs and consequent T-cell activation. Our findings highlight potential feasibility of trx-peptides as a reagent for assessing the immunogenicity of antigenic fragments.

Keywords: MHC class II, antigen presentation, Jurkat 76 TPR, CD80⁺ HeLa