



ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ



НАУКА
— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 519, 2024

Череп <i>Harpalodectes</i> (Harpalodectidae, Mesonychia) из палеоцена Монголии А. В. Лопатин.....	5
Метаболические изменения в миокарде и скелетных мышцах мышей C57bl/6 после некардиологической операции М. В. Кондашевская, В. В. Алексанкина, К. А. Артемьева, К. А. Касабов, Л. В. Кактурский	17
Находка яиц нематоды <i>Diostrophyme renale</i> (Goeze, 1782) (NEMATODA, DIOSTROPHYMIDAE) на севере Западной Сибири в позднем голоцене Т. Н. Сивкова, П. А. Косинцев, В. В. Крапивина	24
Этрусский волк <i>Canis etruscus</i> (CANIDAE, CARNIVORA) из раннего плейстоцена Крыма (пещера Таврида) А. В. Лавров, М. В. Сотникова, Д. О. Гимранов, Х. Мадурелл-Малапейра, А. В. Лопатин	28
Развитие антибиотикорезистентности у пробиотического штамма <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 8p-а3 сопровождается изменениями структуры внеклеточных везикул и характера их влияния на бактериальные биопленки О. А. Чернова, А. Р. Каюмов, М. И. Маркелова, В. В. Сальников, М. П. Кутырева, А. А. Ханнанов, М. С. Федорова, Д. Э. Журавлева, Н. Б. Баранова, Д. А. Файзуллин, Ю. Ф. Зуев, В. М. Чернов.....	35
Роль BDNF в противодепрессивных эффектах электросудорожной терапии В. М. Ушакова, Е. А. Зубков, А. Ю. Морозова, К. А. Павлов, Я. А. Зоркина, О. В. Абрамова, А. Г. Очнева, О. И. Гурина, К. Ш. Тарковская, А. Н. Иноземцев, В. П. Чехонин	42
Изменение активности ферментов энергетического и углеводного обмена у смолтов горбуши <i>Oncorhynchus gorbuscha</i> (Walb.) при смене солености среды Н. С. Шульгина, М. В. Кузнецова, М. А. Родин, М. Ю. Крупнова, Д. А. Ефремов, С. А. Мурзина, Н. Н. Немова	47
Содержание жирных кислот и индексы «качества липидов» у антарктического криля <i>Euphausia superba</i> из трех районов атлантического сектора Антарктики С. А. Мурзина, В. П. Воронин, Д. Г. Битютский, Н. Н. Немова	52
Роль запасных липидов при вертикальных миграциях окуня-клювача (<i>Sebastes mentella</i>) Северной Атлантики В. П. Воронин, А. Ю. Рольский, А. М. Орлов, С. А. Мурзина	60
Возрастные изменения вариабельности сердечного ритма от новорожденных до зрелого возраста А. А. Гриневич, Н. К. Чемерис.....	69
Бактерии <i>Escherichia coli</i> и <i>Micrococcus luteus</i> активируют ген CG45045 в линии клеток S2 дрозофилы Ю. А. Полунина, А. Э. Праведникова, М. Гасса, П. Г. Георгиев, Ю. В. Шидловский, З. М. Качаев	75

IGFBP6 модулирует протеостаз, активируя мишени ATF4
и снижая экспрессию ретротранслокона ЭПР

О. Е. Колодеева, О. Е. Колодеева, И. Д. Антипенко, А. А. Фаткулин,
М. Р. Яхина, Ю. А. Макарова79

Эффекты повышенной экспрессии специфических субъединиц SAYP, BAP170
комплекса ремоделирования хроматина у *Drosophila melanogaster*

В. К. Чмыхало, Ю. В. Шидловский, Л. А. Лебедева, Р. Schedl, E. Giordano86

Активность ферментов энергетического и углеводного обмена у радужной форели
(*Oncorhynchus mykiss* Walb.) при введении круглосуточного освещения
в условиях аквакультуры Южного региона РФ

М. А. Родин, М. В. Кузнецова, М. Ю. Крупнова, А. Е. Курицын, Н. Н. Немова91

Создание панели биомаркеров для дифференциальной диагностики рассеянного склероза

Л. А. Овчинникова, С. С. Джелад, Т. О. Симанив, М. Н. Захарова, Я. А. Ломакин,
А. Г. Габиров, С. Н. Иллариошкин 98

CONTENTS

Vol. 519, 2024

The skull of <i>Hapalodectes</i> (Hapalodectidae, Mesonychia) from the Paleocene of Mongolia <i>A. V. Lopatin</i>	5
Metabolic Changes in the Myocardium and Skeletal Muscles of C57black/6 Mice after Non-Cardiological Surgery <i>M. V. Kondashevskaya, K. A. Artemyeva, V. V. Aleksankina, K. A. Kasabov, L. V. Kaktursky</i>	17
Finding Eggs of the Nematode <i>Diectophyme Renale</i> (Goeze, 1782) (Nematoda, Diectophymidae) in the North of Western Siberia in the Late Holocene <i>T. N. Sivkova, P. A. Kosintsev, V. V. Krapivina</i>	24
Etruscan wolf <i>Canis etruscus</i> (Canidae, Carnivora) from the Early Pleistocene of Crimea (Taurida cave) <i>A. V. Lavrov, M. V. Sotnikova, D. O. Gimranov, J. Madurell-Malapeira, A. V. Lopatin</i>	28
The Development of Antibiotic Resistance of the Probiotic Strain <i>Lactiplantibacillus Plantarum</i> 8p-A3 is Associated with Changes in the Structure of Extracellular Vesicles and the Character of their Effect on Bacterial Biofilms <i>O. A. Chernova, A. R. Kayumov, M. I. Markelova, V. V. Salnikov, M. P. Kutyreva, A. A. Khannanov, M. S. Fedorova, D. E. Zhuravleva, N. B. Baranova, D. A. Faizullin, Yu. F. Zuev, V. M. Chernov</i>	35
The Role of BDNF in the Antidepressant Effects of Electroconvulsive Therapy <i>V. M. Ushakova, E. A. Zubkov, A. Yu. Morozova, K. A. Pavlov, Ya. A. Zorkina, O. V. Abramova, A. G. Ochneva, O. I. Gurina, K. Sh. Tarkovskaya, A. N. Inozemtsev, V. P. Chekhonin</i>	42
Change in the activity of enzymes of energy and carbohydrate metabolism in pink salmon smolts <i>Oncorhynchus gorbuscha</i> (Walb.) with change in environmental salinity <i>N. S. Shulgina, M. V. Kuznetsova, M. A. Rodin, M. Yu. Krupnova, D. A. Efremov, S. A. Murzina, N. N. Nemova</i>	47
The Content of Fatty Acids and Nutritional Indexes of Lipids of the Antarctic Krill <i>Euphausia Superba</i> Collected from three Regions of the Atlantic Sector of Antarctic <i>S. A. Murzina, V. P. Voronin, D. G. Bityutskii, N. N. Nemova</i>	52
The role of storage lipids in vertical migrations of the beaked redfish (<i>Sebastes mentella</i>) in the North Atlantic <i>V. P. Voronin, A. Y. Rol'skii, A. M. Orlov, S. A. Murzina</i>	60
Age-Related Changes in Heart Rate Variability from the Neonatal Period to Adulthood <i>A. A. Grinevich, N. K. Chemeris</i>	69
<i>Escherichia coli</i> and <i>Micrococcus luteus</i> Bacteria Activate the CG45045 Gene in the <i>Drosophila</i> S2 Cell Line <i>Yu. A. Polunina, A. E. Pravednikova, M. Gassa, P. G. Georgiev, Yu. V. Shidlovsky, Z. M. Kachaev</i>	75

IGFBP6 Modulates Proteostasis by Activating ATF4 Targets and Reducing ER Retrotranslocon Expression	
<i>O. E. Kolodeeva, O. E. Kolodeeva, I. D. Antipenko, A. A. Fatkulin, M. R. Yakhina, J. A. Makarova</i>	79
Effects of Overexpression of Specific Subunits Sayp, Bap170 of the Chromatin Remodeling Complex in <i>Drosophila Melanogaster</i>	
<i>V. K. Chmykhalo, Y. V. Shidlovskii, L. A. Lebedeva, P. Schedl, E. Giordano</i>	86
Activity of energy and carbohydrate metabolism enzymes in rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i> Walb.) with the introduction of 24-hour lighting in aquaculture conditions of the Southern region of the Russian Federation	
<i>M. A. Rodin, M. V. Kuznetsova, M. Yu. Krupnova, A. E. Kuritsyn, N. N. Nemova</i>	91
Development of a panel of biomarkers for differential diagnosis of multiple sclerosis	
<i>L. A. Ovchinnikova, S. S. Dzhelad, T. O. Simaniv, M. N. Zakharova, Y. A. Lomakin, A. G. Gabibov, S. N. Illarioshkin</i>	98

УДК 569.7:551.781.33(517)

ЧЕРЕП *HAPALODECTES* (HAPALODECTIDAE, MESONYCHIA) ИЗ ПАЛЕОЦЕНА МОНГОЛИИ

© 2024 г. Академик РАН А. В. Лопатин¹, *

Поступило 05.09.2024 г.

После доработки 10.09.2024 г.

Принято к публикации 10.09.2024 г.

Из верхнепалеоценовой пачки наран свиты наран-булак местонахождения Хайчин-Ула II в Бугин-Цавской впадине на юге Монголии описан неполный череп *Hapalodectes* (Hapalodectidae, Mesonychia). Это первая находка черепа палеоценового представителя рода. По размерам и зубной окклюзии череп соответствует виду *H. dux* Lopatin, 2001, ранее известному только по нижней челюсти из верхнепалеоценовой пачки жигден свиты наран-булак местонахождения Цаган-Хушу в Нэмэгэтинской впадине. В строении лицевой части черепа *H. dux* демонстрирует признаки, общие с Mesonychidae — значительное участие слезной и скуловой костей в формировании предглазничной области. На верхних молярах *H. dux* установлено наличие отчетливых конулей (впервые для Hapalodectidae). Определены эволюционные изменения в строении верхних моляров *Hapalodectes* (исчезновение конулей, уменьшение метакона, сокращение ширины лингвального выступа), сопряженные с преобразованиями нижних моляров (редукцией метаконида, протокристида и энтокониды, поперечным сжатием тригонида и талонида) и вместе с ними направленные на усиление режущей функции продольных лезвий задней части зубных рядов.

Ключевые слова: *Hapalodectes*, мезонихии, поздний палеоцен, Монголия, череп, верхние моляры, эволюция

DOI: 10.31857/S2686738924060011

Палеоцен-эоценовый род *Hapalodectes*, объединяющий специализированных мелких мезонихий, представлен девятью видами [1]. Среднепалеоценовый *H. lopatini* Solé et al., 2017 (ноншаний, интервал-зона *Bothriostylops*) и позднепалеоценовый *H. paleocenus* Beard et al., 2010 (гашатий) из Китая известны по нижнечелюстным фрагментам [2, 3]. Позднепалеоценовый *H. dux* Lopatin, 2001 из Монголии (гашатий) описан на основании нижней челюсти [4, 5]. Материалы по позднепалеоценовому *H. paradux* Lopatin, 2023 из Монголии (гашатий) и раннеэоценовому *H. anthracinus* Zhou et Gingerich, 1991 из Северной Америки (США, уосач, зона Wa-1) включают только фрагментарные нижнечелюстные остатки [1, 6, 7]. Черепные и верхнечелюстные остатки (помимо нижнечелюстных) известны для раннеэоценовых (бумбанских) *H. hetangensis* Ting et Li, 1987 (интервал-зона *Orientolophus*) и *H. huanghaiensis* Tong et Wang, 2006 (интервал-зона *Homogalax*), среднеэоценового (ирдынмангского) *H. serus* Matthew et Granger, 1925 из Китая и раннеэоценового *H. leptognathus*

(Osborn et Wortman, 1892) из Северной Америки (уосач, зоны Wa-4–Wa-7) [8–13].

Ниже приведено описание уникальной находки неполного черепа *Hapalodectes* в палеоцене Бугин-Цавской впадины на юге Монголии (сборы Южно-Гобийского отряда Совместной советско-монгольской палеонтологической экспедиции под руководством В.Ю. Решетова, 1979 г.). На оригинальной этикетке указано местонахождение Хайчин-Ула II (свита наран-булак). Это известное палеогеновое местонахождение (см. [14]) расположено в 8 км юго-восточнее горы Хайчин-Ула (приблизительно 44° с.ш., 100° в.д.). Свита наран-булак в местонахождении Хайчин-Ула II представлена пачкой наран (верхний палеоцен, гашатий) [14]. В Бугин-Цавской впадине самые полные и наиболее хорошо охарактеризованные ископаемыми остатками отложения этой пачки выявлены в местонахождении Хайчин-Ула I [14, 15]. Также данные отложения выделяются в пачку бугин, которая по остаткам млекопитающих коррелируется с пачкой наран свиты наран-булак Нэмэгэтинской впадины [15]. Описанный из этих отложений миксодонт *Khaychina elongata* Dashzeveg et Russell, 1988 [15] синонимизирован с *Eomylus zhigdenensis* Dashzeveg et Russell, 1988, который известен

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

*e-mail: alop@paleo.ru

из пачек жигден и наран свиты наран-булак Нэмэгэтинской впадины [16].

Это первая находка черепа палеоценового представителя гапалодектид. На основании соответствия размеров, окклюзии и эволюционного уровня строения щечных зубов описанный ниже экземпляр отнесен к виду *Hapalodectes dux*, который ранее был известен из пачки жигден (подстилающей пачку наран) свиты наран-булак местонахождения Цаган-Хушу в Нэмэгэтинской впадине только по голотипу — нижней челюсти с двумя рядами зубов [4, 5]. Комплексы гашатских млекопитающих пачек жигден и наран близки по таксономическому составу и возрасту [14], поэтому присутствие *H. dux* в обеих этих ассоциациях вполне закономерно.

Образец был заключен в плотный матрикс из глинистого алевролита с карбонатным цементом, участками сильно кальцитизированного; в течение длительного времени он препарировался мной механически и химически (9% раствором уксусной кислоты). При препарировании было отмечено, что большая часть повреждений и утрат разных частей черепа произошла еще до (или во время) захоронения образца (так как некоторые очищенные участки оказались разрушенными).

Изученный образец хранится в Палеонтологическом институте им. А.А. Борисяка РАН (ПИН) в Москве. Измерения приведены в мм, сделаны с помощью цифрового штангенциркуля с точностью 0.01 мм и окуляр-микрометра стереомикроскопа Leica MZ6 с точностью 0.05 мм. Изображения получены при помощи цифрового фотоаппарата Nikon D800 с объективом AF-S Micro NIKKOR 60mm f/2.8G ED и рентгеновского микромогерафа Neoscan N80 в ПИН. Параметры сканирования: 101 кВ, 159 мкА, размер пикселя 20 мкм, поворот на 360° с шагом 0.2°, фильтр Cu 0.5 мм. Рентгенографические изображения обработаны с использованием программного обеспечения Neoscan, 3D-модель визуализирована с помощью CTvox (Bruker microCT).

Отряд Mesonychia Matthew, 1937

Семейство Hapalodectidae Szalay et Gould, 1966

Род *Hapalodectes* Matthew, 1909

Hapalodectes dux Lopatin, 2001

Hapalodectes dux: [4], с. 91, рис. 1, 2; [5], с. 475, рис. 1–4; [1], с. 524, рис. 3а, 4а.

Голотип — ПИН, № 3104/371, нижняя челюсть с полными зубными рядами; Монголия, Южная Гоби, Нэмэгэтинская впадина, Цаган-Хушу; верхний палеоцен, свита наран-булак, пачка жигден.

Описание (рис. 1–4). Размеры средние для рода. Лицевая часть черепа (экз. ПИН, № 3404/2) узкая и длинная. Профиль лицевой части черепа почти прямой, слегка вогнутый в предглазничной области и немного выпуклый над задней частью глазниц.

Рострум тонкий, довольно высокий, у конца плавно загнутый. Носовые кости очень узкие, длинные, расширяющиеся кзади, латерально широко контактируют с верхнечелюстными костями (рис. 1). В передней части рострума мелкая предчелюстная кость, узким дистальным концом вклиниваясь между носовой и верхнечелюстной костями, протягивается назад до уровня заднего основания коронки С¹. Верхнечелюстная кость высокая в лицевом отделе. Крупное дорсовентрально вытянутое подглазничное отверстие открывается на уровне Р³. Вентральный край подглазничного отверстия расположен очень низко и сильно приближен к альвеолярному краю верхней челюсти. У входа в подглазничный канал имеется обширная латеральная впадина. Глазница спереди четко обозначена резким полукруглым гребнем. Передний край глазницы располагается над задней частью М¹. Передние корни скуловых дуг массивные, сильно расставленные. Дорсальная часть корня скуловой дуги сформирована лицевым выростом скуловой кости, вентральная — верхнечелюстной костью (рис. 2а, 2б).

В крыше черепа лобные кости прямоугольные, относительно длинные и узкие. Шов между носовыми и лобными костями относительно длинный, W-образный. Боковые расширения лобных костей формируют надглазничные гребни, представляющие собой нависающие края крыши глазниц. Сильнее всего выступают постеролатеральные части лобных костей, образующие мощные заглазничные отростки, которые имеют прямой резкий задний край, перпендикулярный сагиттальной оси черепа. На латеральной стороне сохранившегося левого заглазничного отростка находится вытянутая площадка для прикрепления костной перемычки (сформированной верхним выростом скуловой кости), замыкающей глазницу сзади (сама перемычка утрачена, см. [11]). В передней части дорсальной порции лобной кости имеется крупное продольно вытянутое надглазничное отверстие. Непосредственно под заглазничным отростком, в верхней части медиальной стенки глазницы открывается заднее (выходное) надглазничное отверстие. Соответственно, довольно длинный надглазничный канал проходит внутри кости постероventrolатерально (прослеживается на томографических срезах). Заглазничное сужение у заднего края лобных костей хорошо выражено. Сагиттальный гребень умеренно развитый.

Лицевая порция слезной кости относительно обширная; она отнюдь не ограничивается узким гребнем в антеродорсальном углу глазницы (см. [11, 12]), но формирует здесь широкую предглазничную площадку, имеющую узкий контакт с лобной костью дорсально и широкий контакт с верхнечелюстной костью спереди и скуловой костью вентролатерально (рис. 1, 2).

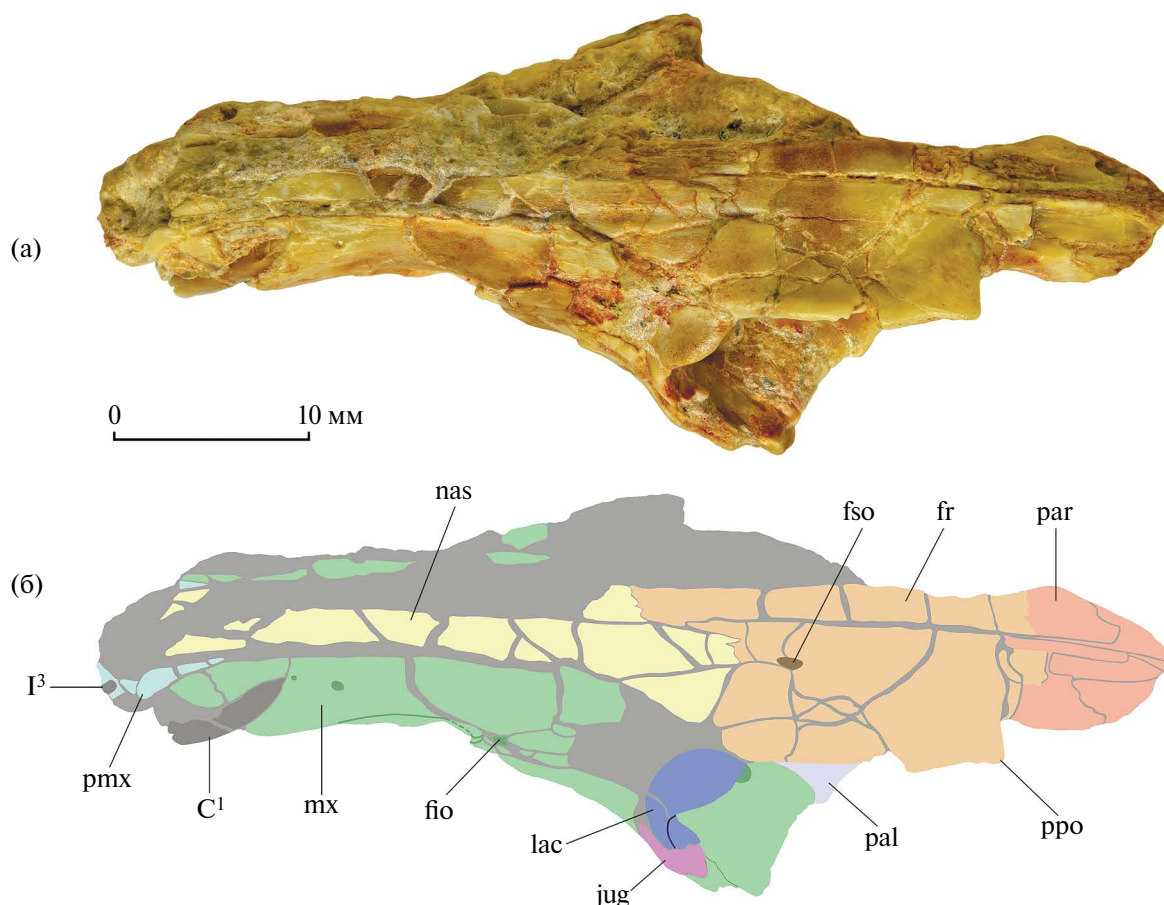


Рис. 1. *Hapalodectes dux* Lopatin, 2001, экз. ПИН, № 3404/2, неполный череп с дорсальной стороны: а – фотография; б – прорисовка по трехмерной компьютерной модели; Монголия, Хайчин-Ула II; верхний палеоцен, свита наранбулак, пачка наран. Обозначения: C¹ – верхний клык; fio – подглазничное отверстие; fr – лобные кости; fso – надглазничное отверстие; I³ – третий верхний резец; jug – скуловая кость; lac – слезная кость; mx – верхнечелюстные кости; nas – носовые кости; pal – небные кости; par – теменные кости; pmx – предчелюстные кости; pro – заглазничный отросток лобной кости.

Внутри глазницы слезная кость формирует ее переднюю стенку над задним отверстием подглазничного канала. Умеренно крупное слезное отверстие расположено в средней части передней стенки глазницы. Заднее отверстие подглазничного канала крупное, округлое; расположено в месте контакта слезной и верхнечелюстной костей. Скуловая кость образует антеродорсальную часть латеральной стенки глазницы. Передняя часть дна глазницы и антеровентральная часть ее латеральной стенки сформированы глазничной порцией верхнечелюстной кости. Позади заднего отверстия подглазничного канала дно глазницы прободено довольно крупным отверстием, связанным с альвеолой лингвального корня M². Медиальная стенка глазницы образована глазничными выростами лобной, верхнечелюстной и небной костей и глазнично-клиновидной костью (от последней

сохранился передний конец, примыкающий к клино-небному отверстию). Клино-небное отверстие крупное, овальное, вытянуто продольно, расположено в базальной части медиальной стенки глазницы, в месте соединения верхнечелюстной, небной и глазнично-клиновидной костей. Непосредственно вентральное, в дне глазницы находится дорсальное небное отверстие, локализованное в пределах небной кости. Задняя часть медиальной стенки глазницы деформирована и фрагментирована.

Костное небо длинное, узкое. Дистальное P³ небо резко расширяется в заднем направлении, достигая наибольшей ширины на уровне M², у передних корней скуловых дуг (рис. 3). Небные кости протягиваются вперед до уровня промежутка между P⁴ и M¹. Передние небные отверстия находятся на уровне протокона M¹, задние небные

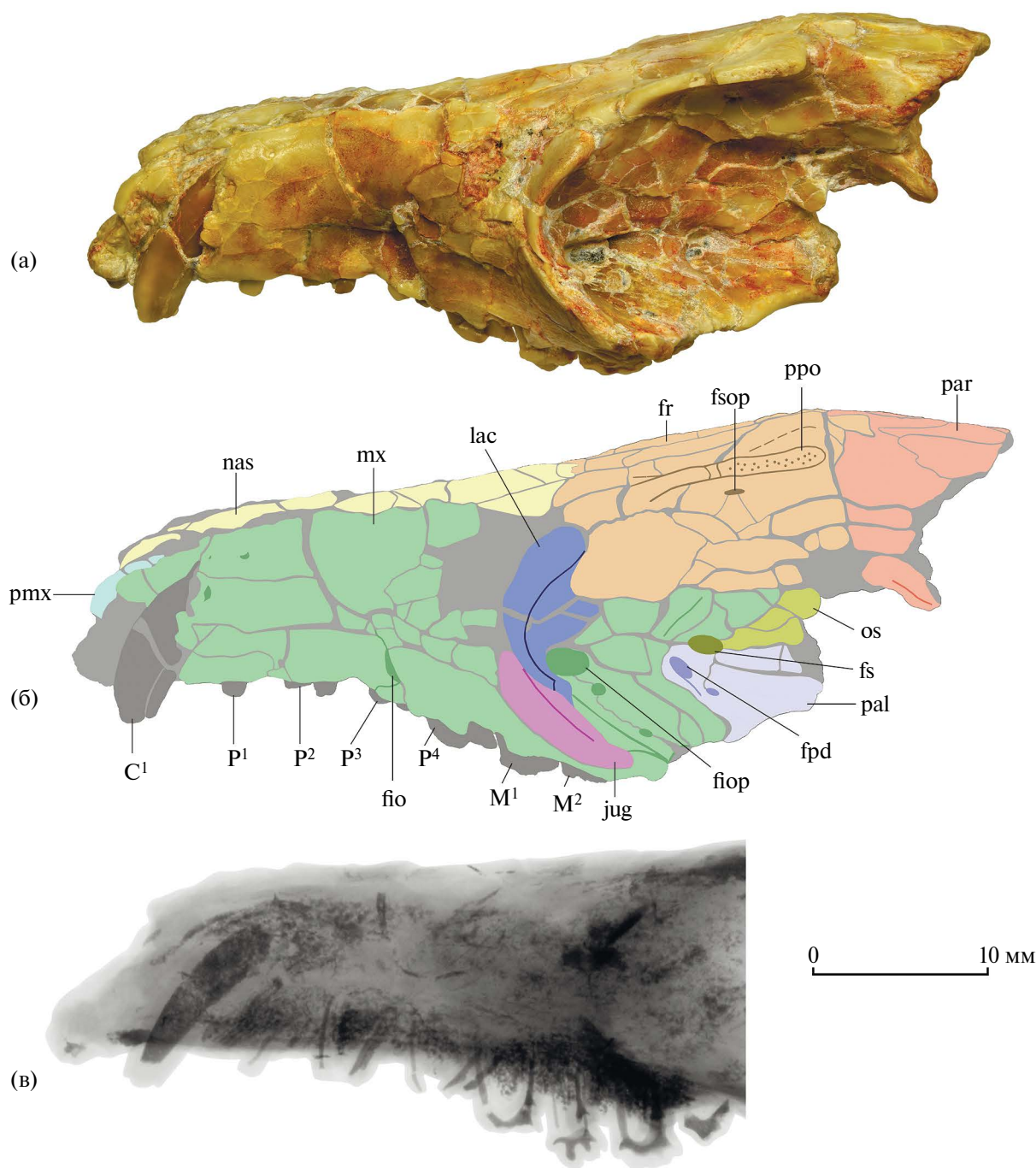


Рис. 2. *Hapalodectes dux* Lopatin, 2001, экз. ПИН, № 3404/2, неполный череп с левой латеральной стороны (а, б – с вентральным наклоном): а – фотография; б – прорисовка по трехмерной компьютерной модели; в – рентгенограмма роstralной части черепа; Монголия, Хайчин-Ула II; верхний палеоцен, свита наран-булак, пачка наран. Обозначения: fio – заднее отверстие подглазничного канала; fl – слезное отверстие; fop – дорсальное небное отверстие; fs – клино-небное отверстие; fsop – заднее надглазничное отверстие; M¹–M² – верхние моляры M¹ и M²; os – глазнично-клиновидная кость; P¹–P⁴ – верхние премоляры P¹–P⁴. Прочие обозначения см. рис. 1.

отверстия расположены на уровне задней части M³. Дополнительные отверстия находятся на уровне метакона M² и паракона M³. Позади заднего небного отверстия имеются еще два небольших

отверстия, лежащих латеральнее хоанальной вырезки. Хоанальная вырезка в форме прямоугольной арки, ее передний край располагается немного дистальнее уровня задних небных отверстий. Занебный

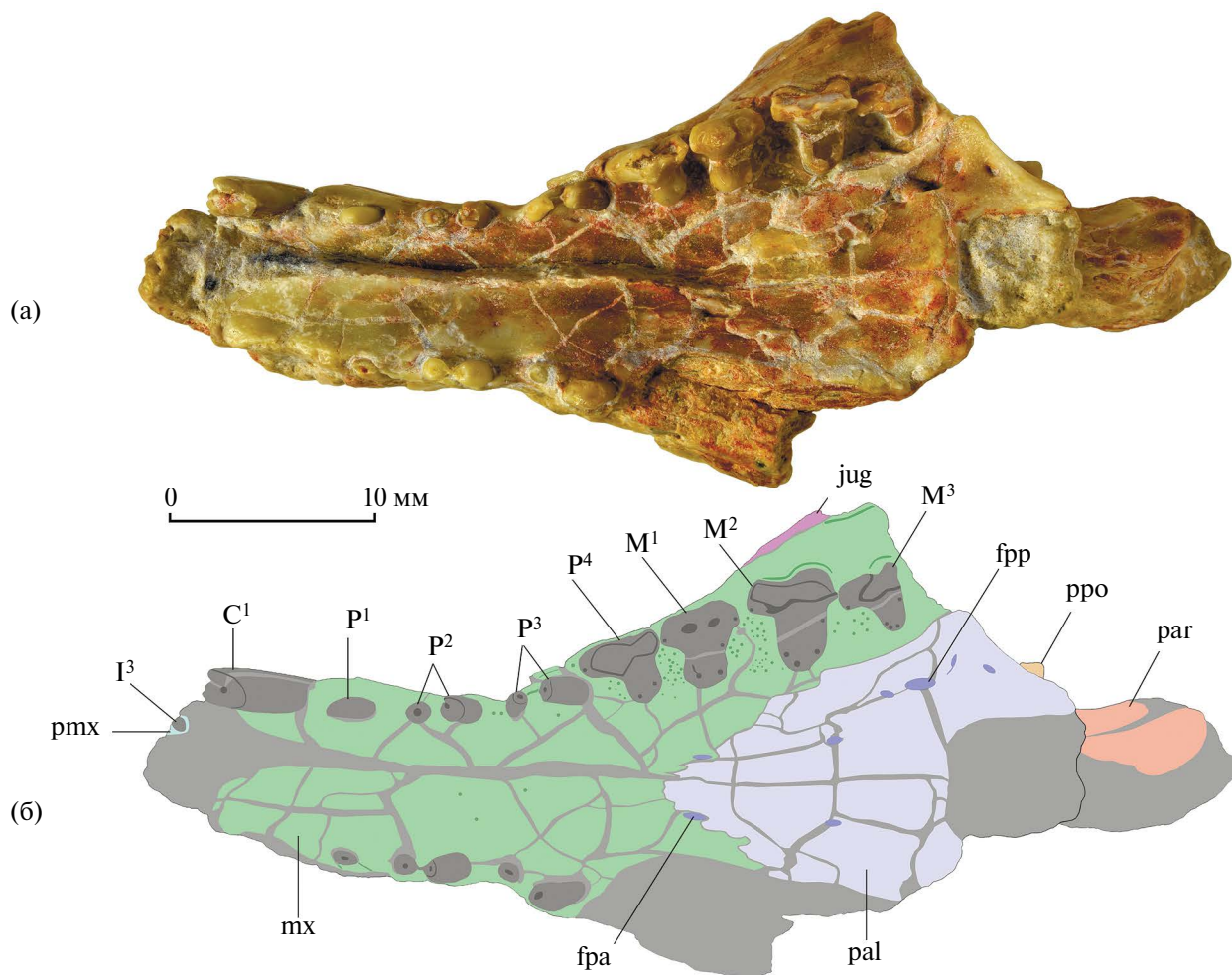


Рис. 3. *Hapalodectes dux* Lopatin, 2001, экз. ПИН, № 3404/2, неполный череп с вентральной стороны: а – фотография; б – прорисовка по трехмерной компьютерной модели; Монголия, Хайчин-Ула II; верхний палеоцен, свита наранбулак, пачка наран. Обозначения: fpa – переднее небное отверстие; fpp – заднее небное отверстие; M³ – последний верхний моляр M³. Прочие обозначения см. рис. 1, 2.

валик выражен легким возвышением вдоль переднего края хоанальной вырезки. Занебная ость не развита.

Теменные кости дорсально узкие, латерально высокие. Большая часть мозговой коробки и основание черепа утрачены.

В левом верхнем зубном ряду сохранились небольшие обломки корней и альвеол резцов I¹–I³, клык C¹ без вершины, в разной степени поврежденные премоляры P¹–P⁴ и моляры M¹–M³, в правом – разрушенные P¹–P³ и фрагменты корней P⁴ и M¹. Фрагменты мелких I¹, I² и I³ (лингвальные стенки альвеол I¹–I², фрагмент I³ в альвеоле) свидетельствуют о плотном расположении резцов на конце ростра. Альвеола I³ значительно удалена от C¹. P¹ отделен от C¹ длинной заклыковой диастемой. Межзубные промежутки P¹/P² и P²/P³ очень крупные, промежутки между лабиальными долями

задних щечных зубов (P³/P⁴, P⁴/M¹, M¹/M² и M²/M³) небольшие, но отчетливые (коронки не соприкасаются). Между лингвальными выступами P⁴–M³ на поверхности верхнечелюстной кости имеются сильно васкуляризованные крупные ямки.

C¹ крупный, поперечно уплощенный, овальный в поперечном сечении, слегка изогнутый, со слабым ребром на задней стороне коронки. Корень C¹ длинный, его верхушка в альвеоле приближена к дорсальной стенке роостра. Корневой канал крупный и широкий (рис. 2в).

P¹ мелкий, однокорневой, его коронка сильно уплощена поперечно и имеет шпательевидную форму (вид сбоку).

P² и P³ двухкорневые. P² приблизительно в полтора раза длиннее P¹. P³ по длине существенно превосходит P², но уступает P⁴. На P² отсутствует дополнительный задний бугорок. P³ с немного

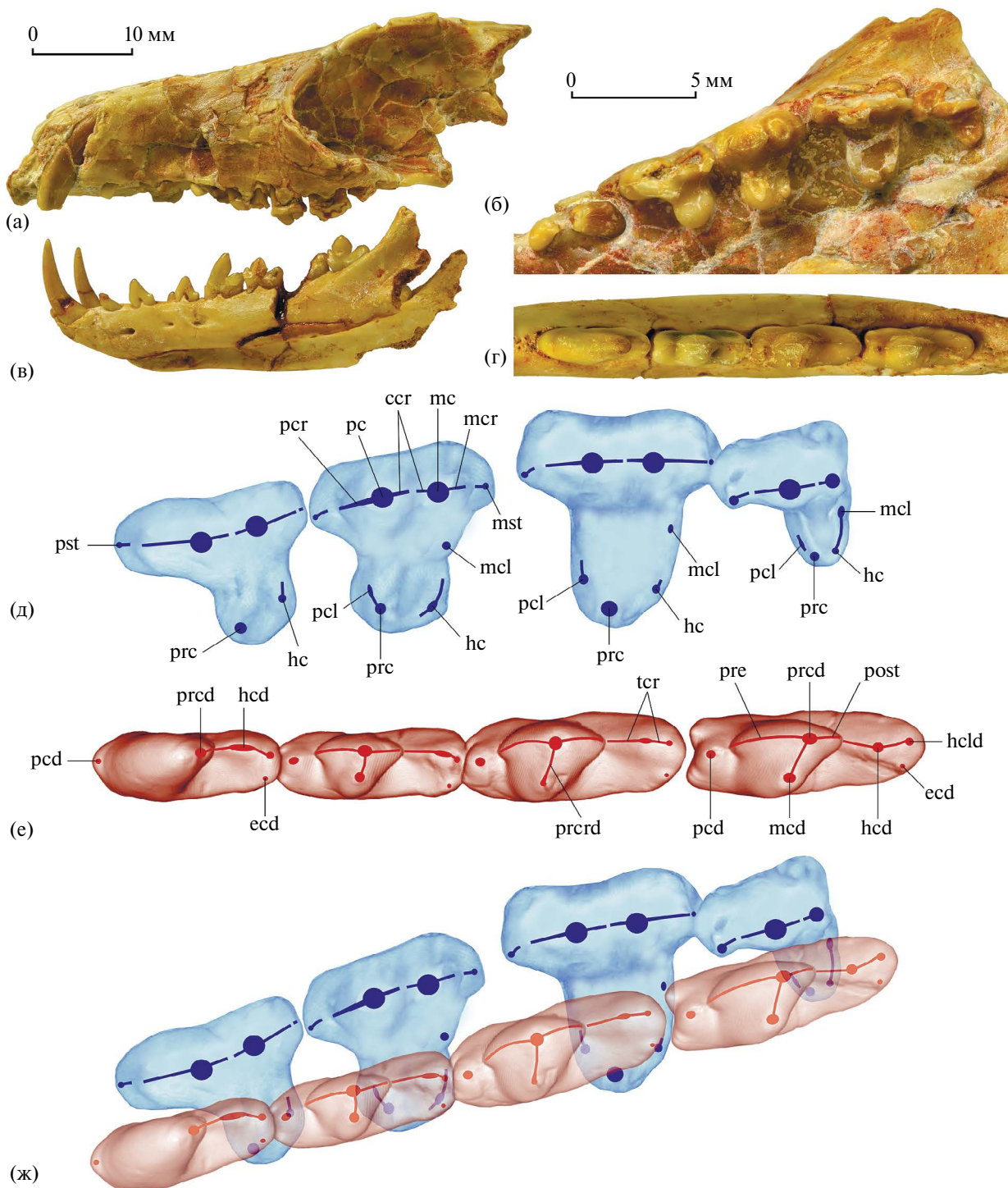


Рис. 4. *Hapalodectes dux* Lopatin, 2001: а, б — экз. ПИН, № 3404/2, неполный череп: а — с левой латеральной стороны; б — область левых P^3-M^3 с окклюзиальной стороны; Монголия, Хайчин-Ула II; верхний палеоцен, свита наран-булак, пачка наран; в, г — голотип ПИН, № 3104/371, нижняя челюсть: в — с левой латеральной стороны, г — область правых P_4-M_3 с окклюзиальной стороны; Монголия, Цаган-Хушу; верхний палеоцен, свита наран-булак, пачка жигден; д — схема строения P^4-M^3 ; е — схема строения P_4-M_3 ; ж — схема окклюзии P^4-M^3 и P_4-M_3 . Обозначения: ccr — центрокриста; ecd — энтоконид; hc — гипокон; hcd — гипоконид; hcd — гипоконуид; mc — метакон; mcd — метаконид; mcl — метаконуль; mcr — метакриста; mst — метастиль; pc — паракон; pcd — параконид; pcl — параконуль; pcr — паракриста; post — постпротокристид; prc — протокон; prcd — протоконид; prcd — протокристид; pre — препротокристид; pst — парастиль; tcr — гребень талонида.

расширенной задней долей, на которой имеется мелкий, но отчетливый дополнительный задний бугорок.

P^4 – M^3 трехкорневые, с коронками Т-образной формы (вид с окклюзиальной стороны). По длине $P^4 \approx M^2 > M^1 > M^3$, по ширине $M^2 > M^1 > P^4 > M^3$ (рис. 3, 4а, 4б).

P^4 – крупный субмоляриформный зуб со сравнительно небольшим лингвальным выступом, развитым заметно слабее, чем на M^1 и M^2 . Отношение длины к ширине коронки составляет около 131%. Лабиальная доля удлиненная и сжатая поперечно. Лингвальный выступ заметно скошен постеролингвально, по длине составляет 38% от лабиальной доли, а по ширине – около 47% от общей ширины коронки. Передняя и задняя стороны лингвального выступа слегка вогнутые. Протокон относительно крупный, округлый, тупой, расположен напротив средней части лабиальной доли. Гипокон мелкий, продольно сжатый, находится постеролабиальнее протокона и отделен от него небольшой складкой; он втрое уступает протокону по массивности, имеет заостренную вершину и гребневидно вытянут лабиально. Небольшая фасетка стирания имеется вблизи апикальной части лингвального склона протокона.

M^1 с длинной лабиальной долей и относительно крупным лингвальным выступом, заметно более длинным и широким, чем у P^4 . Длина и ширина зуба примерно равные. Лабиальная сторона почти прямая, с небольшой впадиной на уровне вырезки между параконем и метаконем. Лабиальная доля образована парастилем, параконем, метаконем и метастилем, расположенными друг за другом и образующими единый продольный ряд, параллельный краю верхнечелюстной кости. Парастиль и метастиль мелкие и слабо выступающие, имеют базальное положение. Паракон несколько выше и массивнее метакона; эти туповершинные бугорки сдвоены в основании и заметно наклонены назад. Паракриста короткая, массивная. Вырезка между параконем и метаконем неглубокая, гребни центрокристы слабо выражены. Метакриста короткая, но резкая. Передний цингулом лингвального выступа тонкий, с мелким цингулярным бугорком мезиальнее вершины протокона. Лабиальный цингулом очень слабый, едва намеченный. Лингвальный выступ слегка скошен антеролингвально, имеет отчетливый продольный пережим посередине. По длине лингвальный выступ составляет 57% от лабиальной доли, а по ширине – около 55% от общей ширины коронки. Протокон расположен напротив паракона, гипокон находится позади протокона и отделен от него широкой складкой. Протокон крупный, высокий, с заостренной конической вершиной и короткой препротокристой, лабиально переходящий в небольшой гребневидный параконуль. Гипокон относительно мелкий и низкий. Между основаниями метакона и гипокона

у заднего края окклюзиальной поверхности расположен довольно крупный уплощенный метаконуль округло-треугольной формы. Паракриста, паракон и метакон отчетливо стерты. Маленькая апикальная фасетка стирания имеется на протоконе.

На M^2 лингвальный выступ сильно развит, отношение длины к ширине коронки около 95%. Слитые в основании паракон и метакон сильно сжаты поперечно. Судя по сохранившейся части лабиальной доли, метакон несколько уступает по величине паракону. Парастиль и метастиль хорошо развитые, сильно выступающие и приподнятые. Лингвальный выступ немного скошен антеролингвально, по длине составляет около половины от лабиальной доли, а по ширине – около 60% от общей ширины коронки. Бассейн тригона обширный, но слабо углубленный. Протокон крупный, массивный, с отчетливой вершиной, но без гребней. Имеется поперечно вытянутый крупный бугорок параконуля, расположенный антеролабиальнее вершины протокона. Метаконуль выражен небольшим возвышением у лингвального основания метакона. Гипокон крупный, широкий, но низкий, с плохо обособленной вершиной, отделен от протокона небольшой складкой. Фасетки стирания протокона и параконуля апикальные.

M^3 намного меньше M^1 и особенно M^2 . Сравнительно небольшой лингвальный выступ сильно скошен постеролингвально и смещен дистально. Отношение длины к ширине коронки составляет около 120%. Крупная парастильная доля сильно выступает вперед. Вершина парастилия расположена в антеролингвальном углу парастильной доли. Паракон несколько крупнее метакона. Паракриста хорошо развита. Лингвальный выступ по длине составляет приблизительно треть от лабиальной доли, а по ширине – около половины общей ширины коронки. Бассейн тригона не выражен, окклюзиальная поверхность центральной части лингвального выступа почти плоская. Протокон и гипокон очень маленькие, лишенные гребней, расположены у лингвального края окклюзиальной поверхности и тесно сближены. Немного антеролабиальнее протокона у переднего края лингвального выступа находится гребневидный рудиментарный параконуль. У лингвального основания метакона располагается поперечно вытянутый метаконуль субтреугольной формы; по размерам он превосходит гипокон и приблизительно равен протокону. Основания гипокона и метаконуля соединены тонким краевым гребнем, тянувшимся по заднему краю лингвального выступа.

Корни верхних щечных зубов длинные и мощные. Корень P^1 сильно отклонен назад (рис. 2в). Корни P^2 и P^3 широко расставленные, расходящиеся (особенно сильно расставлены корни P^3 , поскольку между ними толщина верхнечелюстной кости уменьшена из-за наличия латеральной

впадины перед подглазничным отверстием). Лабиальные корни P^4 широко расставленные, но субпараллельные. Лабиальные корни M^1 и M^2 сближенные, субвертикальные. Корни M^3 сравнительно короткие, широко расставленные. Узкие корневые каналы и крупные пульпарные полости щечных зубов заполнены кальцитом и благодаря этому контрастны на рентгеновских и томографических изображениях (рис. 2в).

Подробное описание нижней челюсти и нижних зубов (голотип) дано ранее [4]; аномальный инвертированный импактный P_3 , находящийся внутри правой нижнечелюстной кости, охарактеризован отдельно [5].

Нижние резцы мелкие, долотовидные, $I_2 > I_1 \approx I_3$. Клык C_1 и премоляры P_1 – P_3 разделены между собой промежутками. C_1 очень длинный, изогнутый, немного уплощенный поперечно, тонкий у вершины, со слабым задним ребром. Высота C_1 над основанием (лабиальная длина по прямой) в 1.5–1.8 раза превышает высоту горизонтальной ветви нижней челюсти под P_3 – M_3 (см. [4]). P_1 мелкий, однокорневой, P_2 и P_3 значительно более длинные и высокие, двухкорневые.

Последний премоляр P_4 и моляры M_1 – M_3 сомкнуты. По длине $M_2 \approx M_3 > P_4 > M_1$. P_4 субмоляриформный, с зачаточным параконидом, отклоненным назад мощным протоконидом и узким талонидом с двумя бугорками (гипоконидом и гипоконулидом) в составе режущего гребня и рудиментарным энтоконидом. M_1 – M_3 секториальные, сжатые поперечно. Параконид вдвое ниже протокониды. Дополнительные передние бугорки (антеролабиальный и антеролингвальный) в основании паракониды хорошо развиты. Протоконидно-метаконидная доля отделена от паракониды и талониды четкими вырезками. Протоконид крупный и высокий, с лабиальной стороны имеет характерные ланцетовидные очертания. Режущие лезвия протокониды (препротокристин и постпротокристин) мощные, угол между ними близок к прямому (латеральный вид). Метаконид отчетливо выраженный, с хорошо обособленной вершиной. Постеролингвальная сторона протоконидно-метаконидной доли с заметной выемкой, выделяющей метаконид дистально. Вершины протокониды и метакониды соединены удлинненным четким протокристин, слегка скошенным вперед. Угол между протокристин и препротокристин в горизонтальной плоскости (протокристинный угол) около 75° на M_1 , 65° на M_2 и 60° на M_3 . Талонид сравнительно широкий, не уступает по ширине тригонида (протоконидно-метаконидной доле). Мощный режущий гребень талониды включает в своем составе гипоконид и редуцированный гипоконулид. Энтоконид рудиментарный, на M_2 – M_3 имеет вид миниатюрного базального бугорка в постеролингвальной части коронки, на M_1 выражен слабым

утолщением, вытянутым вперед наподобие тонкого цингулида.

Промежутки между передними зубами вмещали коронки противоположных зубов при смыкании челюстей (рис. 4а, 4в). Крупные и глубокие васкуляризованные ямки в проемах между лингвальными выступами P^4 – M^3 (рис. 4б) вмещали вершины самых высоких бугорков P_4 – M_3 при полном закрывании рта (см. [8]). Вершина протокониды P_4 располагалась в ямке перед лингвальным выступом P^4 , вершины протоконидно-метаконидных долей M_1 – M_3 помещались в соответствующие ямки в промежутках P^4/M^1 , M^1/M^2 и M^2/M^3 . Очевидно, при окклюзии между собой взаимодействовали (под определенными углами) следующие главные структурные элементы коронок задних щечных зубов (см. рис. 4ж): паракристы P^4 – гребень протокониды P_4 ; метакристы P^4 – препротокристин M_1 ; паракристы M^1 – постпротокристин M_1 ; метакристы M^1 – препротокристин M_2 ; паракристы M^2 – постпротокристин M_2 ; метакристы M^2 – препротокристин M_3 ; паракристы M^3 – постпротокристин M_3 ; центрокристы P^4 – гребень талониды P_4 (M^1/M_1 , M^2/M_2 , M^3/M_3 соответственно); протокон P^4 – лингвальная часть талониды P_4 (M^1/M_1 , M^2/M_2 , M^3/M_3); гипокон P^4 – параконид M_1 (M^1/M_2 , M^2/M_3). При этом следует полагать, что перед вхождением вершин протоконидно-метаконидных долей нижних моляров в ямки между верхними молярами протокристин каждого из нижних моляров окклюдировал с гребневидным параконидом соответствующего верхнего моляра (рис. 4ж).

Размеры в мм. Экз. ПИН, № 3404/2: длина верхних зубных рядов: C^1 – M^3 – 33.5; P^1 – M^3 – 28.0; P^2 – M^3 – 24.0; P^3 – M^3 – 19.2; P^4 – M^3 – 15.0; M^1 – M^3 – 11.2; длина диастем (sin – левая сторона, dex – правая сторона): I^3/C^1 – 2.0 (sin); C^1/P^1 – 2.2 (sin); P^1/P^2 – 1.9 (sin), 2.0 (dex); P^2/P^3 – 1.5 (dex), 1.55 (sin); верхние зубы (L – наибольшая (лабиальная) длина, LL – лингвальная длина, W – наибольшая ширина, WLL – поперечная ширина лингвального выступа): I^3 (sin): W – ок. 0.7 (фрагмент); C^1 (sin): поперечники основания – 2.4×2.0 ; P^1 (sin): L – 2.15; W – 1.0; P^2 (sin): L – 3.3; W – 1.3; P^2 (dex): L – 3.4; W – 1.2; P^3 (sin): L – 4.0; W – 1.3; P^3 (dex): L – ок. 3.8; W – 1.3; P^4 (sin): L – 4.2; W – ок. 3.2; L/W – ок. 131%; LL – 1.6; WLL – 1.5; M^1 (sin): L – 3.7; W – 3.8; L/W – 97.4%; LL – 2.1; WLL – 2.1; M^2 (sin): L – 4.1; W – ок. 4.3; L/W – ок. 95%; LL – ок. 2.0; WLL – ок. 2.6; M^3 (sin): L – ок. 3.2; W – ок. 2.7; L/W – ок. 118.5%; LL – 0.9; WLL – ок. 1.4; длина лицевой части черепа (до заднего края заглазничных отростков) – ок. 46.5; ширина роострума перед подглазничными отверстиями – ок. 12.0; высота на уровне заглазничных отростков – 17.0.

Голотип, длина нижних зубных рядов: I_1 – M_3 – 34.0; C_1 – M_3 – 33.0; P_4 – M_3 – 18.0; M_1 – M_3 – 13.0; прочие размеры голотипа см. [1, 4].

Таблица 1. Сравнение размеров P⁴–M³ *Hapalodectes* (L – длина, W – ширина, мм; L/W, %)

Параметры	<i>H. dux</i>	<i>H. hetangensis</i> [11, 12]	<i>H. huanghaiensis</i> [13]	<i>H. serus</i> [2, 10]	<i>H. leptognathus</i> [2, 8]
P ⁴ , L	4.2	3.4; 3.4	–	–	–
P ⁴ , W	~3.2	2.9; 3.0	–	–	–
P ⁴ , L/W	~131	113.3; 117.2	–	–	–
M ¹ , L	3.7	3.2; 3.4	4.2	4.9*	–
M ¹ , W	3.8	3.2; 3.3	< 4.4	3.74*	–
M ¹ , L/W	97.4	96.7; 106.2	< 95.5	131 [2]	–
M ² , L	4.1	3.3; 3.5	4.6	–	5.7 [8]
M ² , W	~4.3	3.5; 3.5	5.6	–	5.2 [8]
M ² , L/W	~95	94.3; 100	82.1	–	110 [8]; 113 [2]
M ³ , L	~3.2	2.3; 2.3	< 4.6	–	4.8 [8]
M ³ , W	~2.7	1.6; 1.8	4.2	–	3.6 [8]
M ³ , L/W	~118.5	127.8; 143.7	< 109.5	–	133.3 [8]

*Рассчитано по изображению ([10], рис. 18).

Сравнение. *Hapalodectes dux* существенно крупнее *H. hetangensis* и *H. paradux*, но значительно мельче *H. lopatini*, *H. huanghaiensis*, *H. anthracinus*, *H. leptognathus* и *H. serus* ([1], табл. 1). В строении черепа *H. dux* отличается от *H. hetangensis* прежде всего более обширной лицевой порцией слезной кости.

В строении верхних моляров *H. dux* отличается от всех видов с известными верхними зубами (*H. hetangensis*, *H. huanghaiensis*, *H. serus* и *H. leptognathus*) наличием развитых конулей (у *H. huanghaiensis* присутствие рудиментарных конулей на M¹ определяется мной по изображению ([13], табл. VII, фиг. 2), у других видов конулей на всех верхних молярах отсутствуют). Верхние моляры у *H. dux* относительно более широкие, чем у *H. serus* и *H. leptognathus*, что выражается соотношением длины и ширины коронок (см. табл. 1)

и связано как с меньшей степенью поперечного сжатия паракона и метакона, так и с большей шириной лингвального выступа. Кроме того, *H. dux* отличается от *H. hetangensis* мелкими парастилем и гипоконем M¹ и наличием гипокона на M³; от *H. serus* – мелким парастилем, крупным метаконем и мелким гипоконем M¹; от *H. leptognathus* – крупным метаконем M² и наличием гипокона на M³ (см. табл. 2).

H. dux отличается от *H. lopatini*, *H. paleocenus*, *H. anthracinus*, *H. leptognathus* и *H. hetangensis* приблизительно равной длиной M₂ и M₃ (у первых четырех M₃ сильно увеличен, а у последнего – несколько уменьшен). В строении нижних моляров *H. dux* отличается от *H. paradux* лучше развитым метаконидом и менее скошенным вперед протокристинидом (у *H. paradux* протокристинидный угол около 40° на M₂ и 30° на M₃), а также менее

Таблица 2. Сравнение строения верхних моляров *Hapalodectes*

Параметры	<i>H. dux</i>	<i>H. hetangensis</i> [11, 12]	<i>H. huanghaiensis</i> [13]	<i>H. serus</i> [10]	<i>H. leptognathus</i> [10]
M ¹ , парастиль	Мелкий	Крупный	Мелкий	Крупный	–
M ¹ , метакон	Крупный	Крупный	Крупный	Мелкий	–
M ¹ , параконуль	Имеется	Отсутствует	Рудиментарный*	Отсутствует	–
M ¹ , метаконуль	Имеется	Отсутствует	Рудиментарный*	Отсутствует	–
M ¹ , гипокон	Мелкий	Крупный	Мелкий	Крупный	–
M ² , метакон	Крупный	Крупный	Крупный	–	Мелкий
M ² , параконуль	Имеется	Отсутствует	Отсутствует	–	Отсутствует
M ² , метаконуль	Имеется	Отсутствует	Отсутствует	–	Отсутствует
M ² , гипокон	Крупный	Крупный	Крупный	–	Крупный
M ³ , параконуль	Рудиментарный	Отсутствует	Отсутствует	–	Отсутствует
M ³ , метаконуль	Имеется	Отсутствует	Отсутствует	–	Отсутствует
M ³ , гипокон	Мелкий	Отсутствует	Мелкий	–	Отсутствует

*Наличие рудиментарных конулей на M¹ *H. huanghaiensis* определено по изображению ([13], табл. VII, фиг. 2).

глубокой задней вырезкой и более широким талонидом; от *H. anthracinus* и *H. serus* — наличием метаконида и протокристида; от *H. paleocenus* и *H. leptognathus* — лучше развитым метаконидом; от *H. huanghaiensis* и *H. serus* — наличием энтокониды; от *H. hetangensis*, *H. anthracinus* и *H. leptognathus* — лучше развитым энтоконидом [1]. От *H. lopatini* отличается слабее отогнутым назад протоконидом P_4 и большим превышением длины P_4 над длиной M_1 . Наличие зачаточного параконида на P_4 отличает *H. dux* от *H. lopatini* и *H. hetangensis*.

Замечания. По длине зубных рядов и размерам отдельных зубов описанный череп экз. ПИН, № 3404/2 полностью соответствует нижней челюсти *Hapalodectes dux* (голотип ПИН, № 3104/371; рис. 4в); этот вид по известным параметрам намного крупнее одновозрастного *H. paradux* [1]. Наличие развитых конулей (особенно хорошо выражены метаконуль M^1 , параконуль M^2 и метаконуль M^3) определяет архаичное строение верхних моляров описанного черепа, что соотносится с относительной примитивностью строения нижних моляров *H. dux*. Приведенные выше выводы о характере зубной окклюзии (рис. 4ж) подтверждают отнесение обоих охарактеризованных образцов к одному и тому же виду.

В строении лицевой части черепа *H. dux* демонстрирует признаки, общие с Mesonychidae — значительное участие слезной и скуловой костей в формировании предглазничной области. Это уменьшает число отмеченных ранее (см. [11, 17]) краниологических различий между гапалодектидами и мезонихидами, усиливая доказательства их близкого филогенетического родства.

Материал. В дополнение к голотипу из Цаган-Хушу, деформированный неполный череп с левыми I^3 — M^3 и правыми P^1 — P^3 из местонахождения Хайчин-Ула II (экз. ПИН, № 3404/2).

Гапалодекты рассматриваются как мелкие хищники с массой тела от 200 до 1000–1500 г [1]. Очевидно, наличие длинных острых клыков и режущих моляров отражает гиперкарниворный (гиперплотоядный) образ жизни гапалодектид. В эволюции этой группы прослеживается постепенное прогрессивное развитие признаков, связанных с хищническими адаптациями зубной системы.

Реконструированное филогенетическое древо *Hapalodectes* [2], majority-rule consensus tree) мало учитывает строение верхних зубов, поскольку они известны лишь для нескольких видов — *H. hetangensis* (DP^3 , DP^4 , C^1 — M^3) [11, 12], *H. huanghaiensis* (P^2 , P^3 , M^1 — M^3) [13], *H. leptognathus* (M^2 — M^3) [8, 10] и *H. serus* (P^4 — M^1) [10], а теперь еще и для *H. dux* (C^1 — M^3). С учетом базального филогенетического положения *H. dux* [1–4] представляется возможным с помощью

сравнительного морфологического анализа (табл. 1, 2) оценить эволюционные изменения верхних зубов гапалодектов и использовать эти данные для уточнения представлений об эволюционной истории рода.

Наличие хорошо развитых конулей на верхних молярах (впервые установленное для *Hapalodectidae*) согласуется с базальным эволюционным положением *H. dux*. У других видов четкие конули отсутствуют, лишь для M^1 *H. huanghaiensis* можно предположить наличие рудиментарных бугорков параконуля и метаконуля ([13], табл. VII, фиг. 2). Таким образом, редукция конулей является отчетливой эволюционной тенденцией *Hapalodectes*.

На верхних молярах *H. dux*, *H. huanghaiensis* и *H. hetangensis* метакон не очень сильно уступает по величине паракону, тогда как у *H. leptognathus* и *H. serus* их разница в размерах хорошо выражена. Очевидно, уменьшение метакона в процессе эволюции было связано с усилением режущей функции лабиальной доли верхних моляров, сопряженным с аналогичными изменениями нижних моляров (поперечное сжатие протокониды при редукции метаконида).

Другие отмеченные эволюционные тенденции — увеличение парастия M^1 , расширение гипокона M^1 и редукция гипокона M^3 . Важным эволюционным изменением в строении M^1 — M^2 является сокращение относительной ширины лингвального выступа, которое отражается увеличением значения отношения длины коронок к их ширине (для M^1 от 95–97% у *H. dux*, *H. huanghaiensis* и *H. hetangensis* до 131% у *H. serus*; для M^2 от 94–100% у *H. dux* и *H. hetangensis* до 110–113% у *H. leptognathus*). При этом противоположная тенденция (расширение лингвального выступа M^2) отмечена у *H. huanghaiensis*.

Последовательность ветвления клад *Hapalodectes* можно представить следующим образом [1, 2]: (*H. lopatini* + *H. dux*) ((*H. hetangensis* + *H. huanghaiensis*) (*H. paleocenus* + *H. paradux* (*H. leptognathus* (*H. anthracinus* + *H. serus*))))). Вывод о базальном положении среднепалеоценового *H. lopatini* из Китая и позднепалеоценового *H. dux* из Монголии основан не только на их возрасте, но и на примитивных признаках нижних моляров, включая хорошо обособленный метаконид, относительно крупные дополнительные передние бугорки и широкий талонид с четкими бугорками гипоконида, гипоконулида и энтокониды. Установленное в настоящем исследовании строение верхних моляров *H. dux* позволяет дополнить список примитивных признаков рода *Hapalodectes* наличием конулей на M^1 и M^2 , конулей и гипокона на M^3 , сравнительно широким лингвальным выступом M^1 — M^2 , относительно крупным метаконидом M^1 — M^2 , мелкими парастием и гипоконидом M^1 .

Среди эволюционно более продвинутых видов выделяются две основных клады. Первая из них содержит раннеэоценовых *H. hetangensis* и *H. huanghaiensis*, вторая включает позднепалеоценовых *H. paleocenus* и *H. paradox*, раннеэоценовых *H. anthracinus* и *H. leptognathus* и среднеэоценового *H. serus*. *H. anthracinus* и *H. leptognathus* обитали в Северной Америке, все другие виды — на востоке Азии.

H. hetangensis и *H. huanghaiensis* на верхних молярах утратили отчетливые конулы, но сохранили широкий лингвальный выступ и относительно крупный метакон. У *H. huanghaiensis* остались рудиментарные конулы на М¹ и маленький гипокон на М³. Нижние моляры демонстрируют метаконид с хорошо обособленной вершиной, относительно крупные дополнительные передние бугорки и отчетливые гипоконид и гипоконулид. При этом энтоконид рудиментарный у *H. hetangensis* и отсутствует у *H. huanghaiensis*.

У древнейших представителей второй клады — *H. paleocenus* и *H. paradox*, а также у *H. anthracinus*, верхние зубы не известны. Для М² *H. leptognathus* и М¹ *H. serus* характерны крупные стили, мелкие метаконы, относительно узкие лингвальные выступы, крупные гипоконы и отсутствие конул. Нижние моляры с мелкими гребневидными дополнительными передними бугорками и сильно редуцированными метаконидом и энтоконидом (вплоть до их полного отсутствия у *H. serus*).

Таким образом, эволюционные изменения в строении верхних моляров гапалодектов были четко скоррелированы с ранее установленными преобразованиями нижних моляров [1–4], направленными на усиление режущей функции продольных лезвий задней части зубных рядов. Эти изменения включали поперечное сжатие коронок, удлинение и усиление продольно ориентированных режущих лезвий и редукцию второстепенных по величине морфологических структур, расположенных в области взаимодействия лезвий верхних и нижних зубов. Продольное удлинение лезвий происходило в том числе путем увеличения угла между передними и задними режущими гребнями (паракристой и метакристой на верхних молярах, препротокрестидом и постпротокрестидом на нижних молярах). Усиление режущих лезвий достигалось путем их консолидации за счет уменьшения и поглощения бугорков, входящих в состав гребней (метакона на лабиальной доле верхних моляров, гипоконида и гипоконулида на талониде нижних моляров). Структурами, редуцированными в ходе эволюции, были конулы на верхних молярах, а также метаконид (вместе с протокрестидом) и энтоконид на нижних молярах.

В целом для Mesonychia характерно отсутствие конул на верхних молярах. Однако с учетом сведений о наличии рудиментарных метаконул

у Mesonychidae [18–20] и новых данных по *H. dux* можно полагать, что утрата конул в этих двух эволюционных линиях мезонихий происходила параллельно.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-44-03007 (“Фауны наземных позвоночных мезо-кайнозоя Монголии”), <https://rscf.ru/project/24-44-03007/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследовались ископаемые материалы. Изучение живых животных не проводилось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

У автора отсутствует конфликт интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лопатин А.В. Новый вид *Hapalodectes* (Hapalodectidae, Mesonychia) из палеоцена Монголии // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2023. Т. 513. С. 521–527.
2. Solé F., De Bast E., Yang J. et al. The first species of *Hapalodectes* (Mesonychia, Mammalia) from the middle Paleocene of China (Qianshan Basin, Anhui Province) sheds light on the initial radiation of hapalodectids // Palaeontology. 2017. V. 60. № 3. P. 433–449.
3. Beard K.C., Wang Y.-Q., Meng J. et al. Paleocene *Hapalodectes* (Mammalia: Mesonychia) from Subeng, Nei Mongol: further evidence of “East of Eden” dispersal at the Paleocene-Eocene boundary // Vertebrata Palasiatica. 2010. V. 48. № 4. P. 375–389.
4. Лопатин А.В. Древнейший *Hapalodectes* (Mesonychia, Mammalia) из палеоцена Монголии // Палеонтологический журнал. 2001. № 4. С. 90–96.
5. Лопатин А.В. Зубная аномалия у *Hapalodectes dux* (Hapalodectidae, Mesonychia) из позднего палеоцена Монголии // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2023. Т. 512. С. 474–479.
6. Zhou X., Gingerich P.D. New species of *Hapalodectes* (Mammalia, Mesonychia) from the early Wasatchian, early Eocene, of northwestern Wyoming //

- Contributions from the Museum of Paleontology, University of Michigan. 1991. V. 28. № 9. P. 215–220.
7. O'Leary M.A., Rose K.D. New mesonychian dentitions from the Paleocene and Eocene of the Bighorn Basin, Wyoming // *Annals of the Carnegie Museum*. 1995. V. 64. № 2. P. 147–172.
 8. Guthrie D. The mammalian fauna of the Lysite Member, Wind River Formation (early Eocene), of Wyoming // *Memoirs of the Southern California Academy of Sciences*. 1967. V. 5. P. 1–53.
 9. Szalay F.S., Gould S.J. Asiatic Mesonychidae (Mammalia, Condylarthra) // *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 1966. V. 132. Art. 2. P. 129–174.
 10. Szalay F.S. The Hapalodectinae and a phylogeny of the Mesonychidae (Mammalia, Condylarthra) // *American Museum Novitates*. 1969. № 2361. P. 1–26.
 11. Ting S., Li C. The skull of *Hapalodectes* (?Acreodi, Mammalia), with notes on some Chinese Paleocene mesonychids // *Vertebrata Palasiatica*. 1987. V. 25. № 3. P. 161–186.
 12. Ting S., Wang Y., Schiebout J.A. et al. New Early Eocene mammalian fossils from the Hengyang Basin, Hunan China // *Bulletin of Carnegie Museum of Natural History*. 2004. № 36. P. 291–301.
 13. Tong Y., Wang J. Fossil mammals from the Early Eocene Wutu Formation of Shandong Province // *Palaeontologia Sinica*. New Ser. C. 2006. № 28. P. 1–195.
 14. Бадамгарав Д., Решетов В.Ю. Палеонтология и стратиграфия палеогена Заалтайской Гоби. М.: Наука, 1985 (Тр. ССМПЭ. Вып. 25).
 15. Dashzeveg D., Russell D.E. Palaeocene and Eocene Mixodontia (Mammalia, Glires) of Mongolia and China // *Palaeontology*. 1988. V. 31. № 1. P. 129–164.
 16. Kondrashov P., Lopatin A.V. Late Paleocene mixodonts from the Tsagan-Khushu locality, Mongolia // *Journal of Vertebrate Paleontology*. 2003. V. 23. Suppl. to № 3. P. 68A (Abstracts of papers. 63rd Annual Meeting of the Society of Vertebrate Paleontology. St. Paul, Minnesota, October 15–18, 2003).
 17. Zhou X., Zhai R., Gingerich P.D., Chen L. Skull of a new mesonychid (Mammalia, Mesonychia) from the Late Paleocene of China // *Journal of Vertebrate Paleontology*. 1995. V. 15. № 2. P. 387–400.
 18. Geisler J.H., McKenna M.C. A new species of mesonychian mammal from the lower Eocene of Mongolia and its phylogenetic relationships // *Acta Palaeontologica Polonica*. 2007. V. 52. № 1. P. 189–212.
 19. Jin X. New mesonychid mammals found from Lower Paleogene of Erlan Basin, Nei Mongol // *Vertebrata Palasiatica*. 2012. V. 50. № 3. P. 245–257.
 20. Solé F., Godinot M., Laurent Y. et al. The European mesonychid mammals: phylogeny, ecology, biogeography, and biochronology // *Journal of Mammalian Evolution*. 2018. V. 25. P. 339–379.

THE SKULL OF *HAPALODECTES* (HAPALODECTIDAE, MESONYCHIA) FROM THE PALEOCENE OF MONGOLIA

Academician of the RAS A. V. Lopatin

Borissiak Paleontological Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
e-mail: alopai@paleo.ru

The incomplete skull of *Hapalodectes* (Hapalodectidae, Mesonychia) is described from the Upper Paleocene Naran Member of the Naran Bulak Formation of the Khaychin-Ula 2 locality in the Bugin Tsav Basin in the south of Mongolia. This is the first discovery of the skull of a Paleocene member of the genus. The skull corresponds in size and dental occlusion to the species *H. dux* Lopatin, 2001, previously known only from a lower jaw from the Upper Paleocene Zhigden Member of the Naran Bulak Formation of the Tsagan-Khushu locality in the Nemegt Basin. In the structure of the facial part of the skull, *H. dux* exhibits features shared with Mesonychidae, namely the significant participation of the lacrimal and jugal in the preorbital region. The upper molars of *H. dux* were found to have distinct conules (a first for Hapalodectidae). The evolutionary changes in the structure of the upper molars of *Hapalodectes* (disappearance of the conules, decrease of the metacone, and narrowing of the lingual lobe) are determined. They were correlated with the transformations of the lower molars (reduction of the metaconid, protocristid, and entoconid, transverse compression of the trigonid and talonid) and together with them were aimed at enhancing the shearing action of the longitudinal blades of the posterior part of the dentitions.

Keywords: *Hapalodectes*, Mesonychia, Late Paleocene, Mongolia, skull, upper molars, evolution

УДК 612.67. 612.017

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МИОКАРДЕ И СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ МЫШЕЙ C57BL/6 ПОСЛЕ НЕКАРДИОЛОГИЧЕСКОЙ ОПЕРАЦИИ

© 2024 г. М. В. Кондашевская*, В. В. Алексанкина, К. А. Артемьева, К. А. Касабов, член-корреспондент РАН Л. В. Кактурский

Поступило 16.08.2024 г.

После доработки 22.08.2024 г.

Принято к публикации 23.08.2024 г.

Определено, что около 10% пациентов, не имеющих сердечно-сосудистых заболеваний, перенеся некардиологическую хирургическую операцию (ХО), страдают от повреждения миокарда (ПМ) и имеют 10% риск смерти в течение 30 дней после ХО. Предоперационный стресс (ПС) повышает риск ПМ после ХО (ПМХО). Механизмы ПМХО недостаточно изучены. Последствием многих ХО является гиподинамия с развитием слабости и утомляемости. На сегодняшний день связь между ХО и изменениями морфофункционального состояния мышц в послеоперационном периоде изучена неудовлетворительно. В данном исследовании впервые обнаружено, что у мышей C57BL/6 метаболические и гормональные изменения, индуцируемые ПС+ХО, а также самой ХО, являются причинными факторами, лежащими в основе механизмов ПМХО в послеоперационном периоде. Также впервые обнаружено, что даже невысокие значения триглицерид-глюкозного индекса могут указывать на ишемические/гипоксические повреждения миокарда и скелетных мышц. Необходимы дополнительные исследования, посвященные воздействию ПС и ХО на миокард и мышечную работоспособность, а также рискам и пользе периоперационного лечения.

Ключевые слова: мыши C57Black/6, хирургическая операция, наркоз, метаболические и гормональные изменения, ишемия миокарда и скелетной мышцы

DOI: 10.31857/S2686738924060025

ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире ежегодно проводится множество некардиальных операций, которые, как выяснилось, связаны с повышенной частотой неблагоприятных периоперационных сердечно-сосудистых событий. После обширного исследования, выполненного в 2014 г. коллективом медицинских сотрудников Канады, США, Швейцарии и Великобритании, появился термин “myocardial injury after non-cardiac surgery (MINS)”, относящийся к повреждению миокарда вследствие некардиальной операции [1]. Масштаб проблемы значителен. Подсчитано, что из 200 миллионов пациентов, ежегодно подвергающихся некардиальным операциям по всему миру, 8 миллионов страдают

от MINS, и, вероятнее всего, 1 миллион взрослых умрет в течение 30 дней после операции [2]. Несомненно, наличие сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) обуславливает значительное число смертей [3]. Тем не менее проблема MINS касается и пациентов без ССЗ. Предполагаемыми механизмами повреждения миокарда в периоперационном периоде являются: нарушение целостности, или разрыв атеросклеротической бляшки, состояние гиперкоагуляции, повышение уровня катехоламинов, нарушение сердечного ритма, а также несоответствие потребности в кислороде его поступлению в миокард [4]. В то же время каждый из указанных механизмов имеет как клинические и экспериментальные подтверждения, так и опровержения.

В когортных рандомизированных исследованиях установлено, что почти четверть пациентов, подвергавшихся внесердечным операциям, испытывали депрессию или тревогу перед операцией. Такие предоперационные эмоции являются существенным предиктором увеличения длительности пребывания в клинике в связи

¹ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского”, Москва, Россия
*e-mail: marivladiko@mail.ru

с послеоперационными осложнениями и несоизмеримо выраженными послеоперационными болями, обуславливающими повышение потребления транквилизаторов и анальгетиков, обладающих многочисленными негативными эффектами в отношении миокарда. Оценка кардиального риска является краеугольным камнем рационального периоперационного ведения пациентов при инвазивных хирургических вмешательствах [5]. Функциональным последствием многих разновидностей хирургических операций является гиподинамия с развитием слабости и утомляемости. По поводу состояния скелетной мускулатуры мы можем заключить, что на сегодняшний день лишь в нескольких исследованиях изучалась связь между хирургическим вмешательством и изменениями морфофункционального состояния мышц в послеоперационном периоде [6, 7].

Цель данного исследования – охарактеризовать в послеоперационном периоде метаболическое состояние миокарда и скелетной мышцы лабораторных грызунов, подвергавшихся некардиологической хирургической операции с применением ингаляционной анестезии и моделированием предоперационного стресса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены в осенне-зимний период на половозрелых генетически однородных самцах мышей C57BL/6 ($n=40$; питомник “Столбовая”) с исходной массой тела 18–20 г. Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к воде и стандартному полноценному сухому полнорационному гранулированному комбикорму ПК-120 для лабораторных животных. Были сформированы 4 группы (по 10 особей в каждой). 1-я группа – контрольная (К); 2-я – предоперационный стресс + хирургическая операция (группа СХО) под ингаляционным наркозом (ИН, диэтиловый эфир); 3-я – хирургическая операция под ИН без стресса (группа ХО); 4-я – воздействие только ИН (группа ИН).

Животных выводили из эксперимента путем декапитации под ИН на 15-й день после ХО, то есть на 25-й день от начала опыта (рис. 1). Сразу после этого производили забор необходимого для исследований материала.

Моделирование предоперационного стресса

Предоперационный стресс индуцировали, используя предаторный стресс (страх жертвы перед хищником), подвергая мышей воздействию запаха кошачьей мочи (10 мин) в течение 10 сут. На 11-е сутки животным проводили хирургическую операцию, используя ИН.

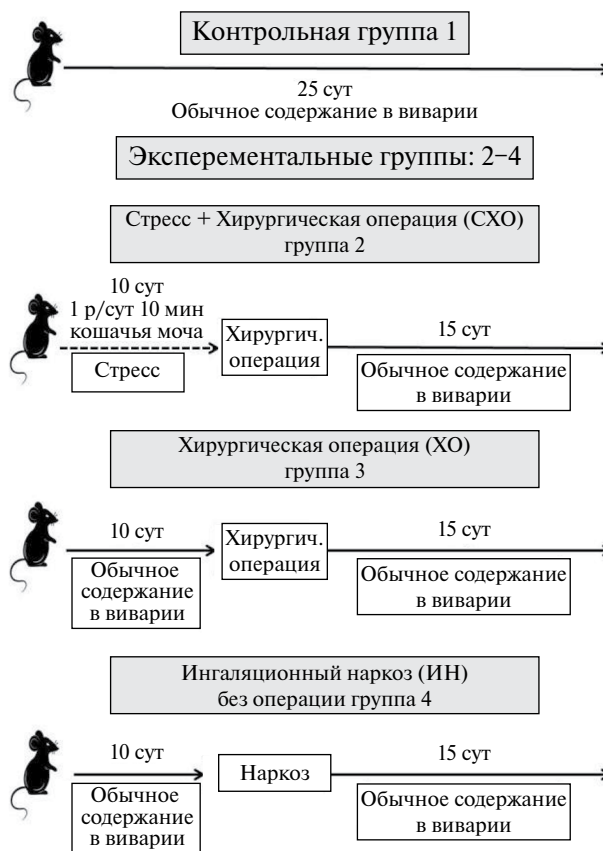


Рис. 1. Дизайн эксперимента.

Процедура хирургической операции

Мышь размещали на спине, среднюю часть брюшка выбривали, с соблюдением правил асептики и антисептики, по белой линии живота наносили сквозной разрез брюшной стенки вплоть до брюшины. Длина разреза 10 ± 2 мм, контроль осуществлялся с помощью электронного штангенциркуля. Рану послойно ушивали хирургической нитью (“Ультрасорб” USP 5-0, “Линтекс”) непрерывным обвивным швом, шов обрабатывали спреем “Террамицин” (Zoetis, IGS Aerosol GmbH). Через 15 сут шов уже не обнаруживался, брюшко зарастало шерстью.

Биохимический анализ

Животных выводили из эксперимента путем декапитации под ИН, брали кровь из шейных сосудов. В сыворотке крови на автоматическом биохимическом анализаторе Random Access A-25 (BioSystems, Испания) определяли уровень глюкозы и триглицеридов (ТГ) (BioSystems, Испания). Рассчитывали значения триглицерид-глюкозного индекса (ТГИ) по формуле: $\text{ТГИ} = \ln [\text{триглицериды натошак} \times \text{глюкоза натошак}] / 2$ [8].

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Используя иммуноферментные наборы, с помощью микропланшетного иммуноферментного анализатора “ANTHOS 2010” (Австрия), в плазме крови определяли уровень кортикостерона с использованием набора реагентов “IBL” (Германия).

Гистологические исследования

Для морфофункционального анализа брали образцы скелетной мышцы (m. acromiotrapezius) и миокарда левого желудочка, которые фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезвоженные образцы заключали в гистомикс, изготавливали срезы толщиной 5 мкм. Для определения уровня гликогена использовали метод А.Л. Шабадаша с проведением контрольных опытов с амилазой. С целью выявления зон гипоксии в неокрашенных срезах, применяли поляризационную микроскопию (поляризационные фильтры микроскопа “Axioplan 2 imaging”), кроме того, срезы окрашивали методом ГОФП по J.T. Lie. Окраска исходно разработана для выявления ишемических изменений миокарда. Название метода окраски “ГОФП” произошло от первых букв используемых красителей: гематоксилин, основной фуксин, пикриновая кислота [9, 10]. На микрофотографиях срезов, полученных с помощью микроскопа “Axioplan 2 imaging”, проводили определение оптической плотности окраски, или аутофлуоресцентного свечения, используя компьютерную программу ImageJ (Fiji). Все изображения были получены при равных условиях, значения выражены в пикселях ImageJ. Измерение всех параметров производили слепым методом.

Статистический анализ

Статистический анализ полученных данных проводили в программе Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.). Исследуемые группы сравнивали с использованием ANOVA, критерия Крускала–Уоллиса для множественных сравнений и *U* критерия Манна–Уитни для парных сравнений. Данные представлены в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартиля (25%; 75%). Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ни одно из применяемых в эксперименте воздействий не провоцировало изменения внешнего вида и различий массы тела мышей в какие-либо периоды эксперимента.

В конце эксперимента у мышей групп СХО и ХО наблюдалось снижение уровня глюкозы

в крови (рис. 2). Этот процесс сопровождался возрастанием содержания триглицеридов и, самое важное, повышением триглицерид-глюкозного индекса (ТГИ, рис. 2). ТГИ был разработан в 2008 г., он проявил себя как высокочувствительный (84.0%) и специфичный тест (45.0%) для определения инсулинорезистентности и выявления пациентов с высоким риском развития диабета [8]. Достаточно скоро было установлено, что ТГИ может рассматриваться как доступный и надежный показатель для определения лиц с высоким риском развития ССЗ различного генеза [11].

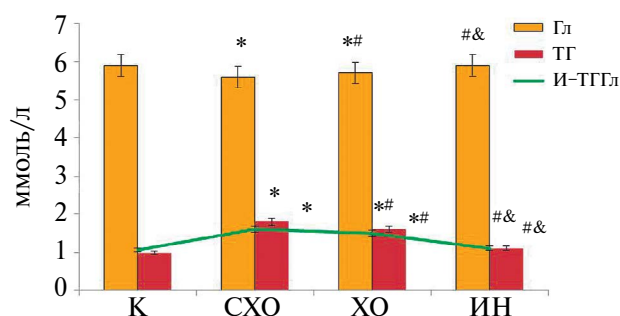


Рис. 2. Показатели уровня глюкозы и триглицеридов в крови мышей C57BL/6 в послеоперационном периоде, значения триглицерид-глюкозного индекса. К – контроль, СХО – группа стресс + хирургическая операция, ХО – хирургическая операция, ИН – ингаляционный наркоз, Гл – глюкоза, ТГ – триглицериды, И-ТГГл – триглицерид-глюкозный индекс.

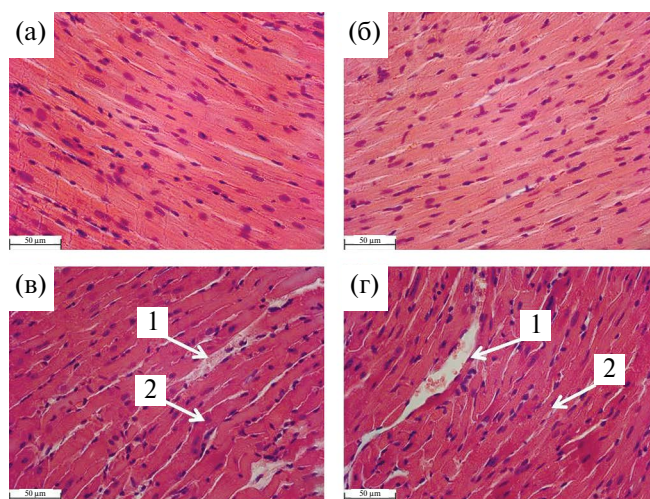


Рис. 3. Миокард мышей C57BL/6 в послеоперационном периоде.

А – контроль, В – ингаляционный наркоз, С – стресс + хирургическая операция, Д – хирургическая операция. Окраска гематоксилин и эозин, Ув. 400.

Стрелками 1 указаны кровеносные сосуды со сладжированными эритроцитами, стрелками 2 – извитость кардиомиоцитов.

В настоящее время ТГИ широко применяется как в клинической практике, так и в экспериментальных исследованиях [12].

В нашем эксперименте мыши получали обычный комбикорм, не вызывающий ожирения, гипергликемии и экспериментального диабета, в связи с этим, значения ТГИ были не столь велики, как при моделировании диабета [12]. Тем не менее, мы решили изучить морфофункциональное состояние миокарда и скелетной мышцы (m. acromiotrapezius) в послеоперационном периоде.

При вскрытии животных макроскопических изменений сердца не выявлено. Оценивая структуру миокарда на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, у мышей контрольной группы и группы, получавшей только ИН, было отмечено, что кардиомиоциты имели равномерную окраску цитоплазмы и ядер, все структуры сохраняли характерное гистологическое строение (рис. 3А, В). Морфология миокарда животных обеих оперированных групп, СХО и ХО, характеризовалась явлениями небольшой волнообразной деформации мышечных волокон, сладжирования эритроцитов в сосудах микроциркуляторного русла (рис. 3С, D). Анализ структуры мышечных волокон, окрашенных гематоксилином и эозином не выявил никаких особенностей ни у одной группы животных.

Однако с помощью поляризационной микроскопии в миокарде и скелетных мышцах были выявлены зоны аутофлуоресценции, идентифицирующие участки ишемии у групп мышей СХО и ХО (рис. 4В, С, D, рис. 5В, С, D). Следует отметить, что даже у группы ИН в мышечных волокнах определялись единичные светящиеся зоны (рис. 4В, рис. 5В).

Измерение оптической плотности аутофлуоресценции и окраски ГОФП позволило зарегистрировать статистически значимое отличие морфофункционального состояния миокарда и скелетных мышц экспериментальных групп мышей от контроля (табл. 1).

Аутофлуоресценция поперечнополосатой мускулатуры — давно известное явление, по которому судят о степени ишемического состояния, индуцирующего гипоксию. Одним из основных источников аутофлуоресценции являются нуклеотиды (пиридиновые и флавиновые), находящиеся в цитозоле и митохондриях миоцитов [13]. Накопление никотинамидадениннуклеотида (НАДН) и никотинамидадениннуклеотидфосфата (НАДФН) инициирует перекисное окисление липидов, обуславливающее продукцию активных форм кислорода в миоцитах [14]. Следовательно, применение в нашем эксперименте поляризационной микроскопии позволило установить, что в послеоперационном периоде в скелетных мышцах и миокарде мышей

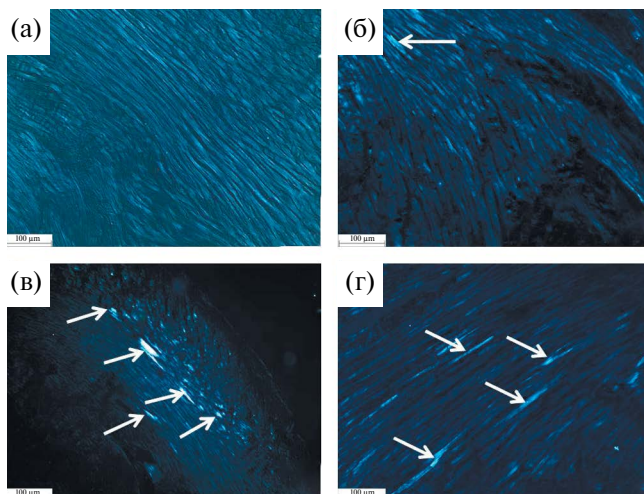


Рис. 4. Аутофлуоресценция кардиомиоцитов мышей C57BL/6 в послеоперационном периоде. Все обозначения те же, что и на рис. 2. Стрелками указаны зоны ишемии.

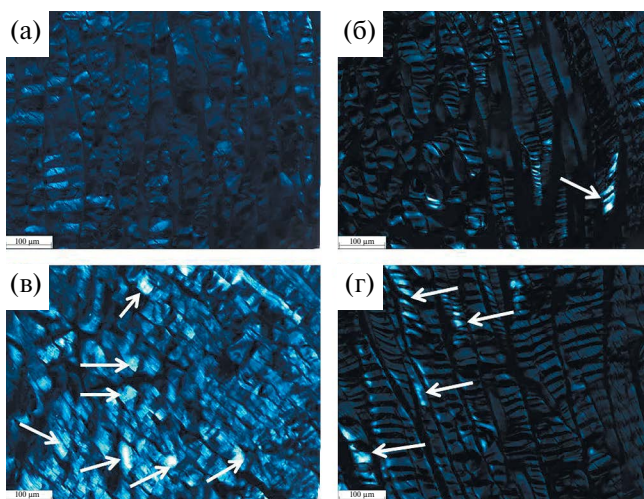


Рис. 5. Аутофлуоресценция миоцитов мышей C57BL/6 в послеоперационном периоде. Все обозначения те же, что и на рис. 3. Стрелками указаны зоны ишемии.

возникает состояние ишемии/гипоксии, то есть нарушение тканевого и клеточного дыхания. Дополнительным доказательством развития ишемии служила окраска гистологических срезов методом ГОФП, используемого для окрашивания в красный цвет фуксинофильного субстрата — участков повреждения миоцитов, или кардиомиоцитов (табл. 1) [9, 10].

Выявленные нами ишемия и гипоксия в скелетных мышцах и миокарде свидетельствуют о нарушении энергетического метаболизма, одним из важных компонентов которого является глюкоза.

Таблица 1. Показатели кортикостерона и оптической плотности окрашенных и неокрашенных (аутофлюоресценция) гистологических препаратов миокарда и скелетной мышцы мышей C57BL/6 в послеоперационном периоде

Показатели/Группы	Органы	Контроль	СХО	ХО	ИН
ОП аутофлюо-ресценции рх	Миокард	24.1 (19.5; 29.3)	50.6* (46.8; 54.5)	41.1*# (36.5; 45.5)	29.5*#& (23.3; 34.5)
	Мышца	21.4 (18.3; 24.8)	46.2* (40.3; 51.5)	39.8*# (36.5; 43.3)	21.5*#& (17.1; 25.8)
ОП ГОФП рх	Миокард	90.1 (80.5; 100.2)	171.5* (160.1; 183.8)	155.3*# (143.8; 166.3)	103.6*#& (93.3; 112.2)
	Мышца	56.1 (48.8; 62.5)	157.3* (149.3; 166.1)	144.5*# (141.5; 148.1)	53.2*#& (46.8; 59.1)
ОП ШИК рх	Миокард	230.3 (211.7; 244.1)	170.8* (158.3; 183.1)	184.7*# (168.3; 200.1)	229.9*#& (214.3; 247.8)
	Мышца	193.5 (182.1; 205.3)	155.9* (145.7; 164.8)	163.4* (153.7; 172.5)	191.3*#& (170.1; 204.8)
Кортикостерон пг/мл	Кровь	62.3 (56.2; 67.1)	35.8* (30.7; 41.1)	80.6*# (74.8; 90.2)	64.6*#& (59.7; 68.3)

Примечание. СХО – группа стресс + хирургическая операция, ХО – хирургическая операция, ИН – ингаляционный наркоз, рх – пиксели программы ImageJ. $p < 0.05$ по сравнению *с контролем, #с группой СХО, &с группой ХО (U критерий Манна–Уитни).

На рис. 2 мы продемонстрировали небольшое, но статистически значимое снижение уровня глюкозы. Проведенная нами ШИК реакция на выявление запасов гликогена, позволила зарегистрировать снижение уровня этого полисахарида в миокарде и мышце СХО и ХО групп на 26 и 20%, 20 и 16% соответственно (табл. 1). Ранее мы указывали на сокращение ресурсов гликогена в печени при стрессе [15]. В связи с этим мы с большой долей уверенности можем считать, что в послеоперационном периоде миокард и скелетные мышцы мышей находились в состоянии дефицита энергетических ресурсов в виде углеводов. Тем не менее хорошо известно, что мышечная система обоих органов способна адаптироваться и переходить на другие резервы. Одним из них являются триглицериды, повышение содержания которых в крови мы зарегистрировали (рис. 2). Однако возрастание значений ТГИ свидетельствует о нарушении метаболизма изучаемых нами органов [11]. Кроме того, вероятно нарушается также механизм регуляции уровня глюкозы кортикостероном. Снижение содержания глюкозы в крови является стрессом для организма, антистрессорная функция глюкокортикоидов заключается в повышении уровня этого углевода. Тем не менее этого не наблюдается в нашем эксперименте ни при понижении уровня кортикостерона в крови (группа СХО, табл. 1), ни при возрастании содержания этого гормона (группа ХО, табл. 1).

Таким образом, в данном исследовании впервые обнаружено, что метаболические и гормональные изменения, индуцируемые предоперационным стрессом, а также самой хирургической операцией, являются решающими причинными факторами, лежащими в основе механизма

повреждения миокарда и скелетных мышц у мышей C57BL/6 в послеоперационном периоде. Также впервые обнаружено, что даже невысокие значения триглицерид-глюкозного индекса могут указывать на ишемические/гипоксические повреждения миокарда и скелетных мышц. Предоперационный стресс значительно ухудшал морфофункциональное состояние исследуемых органов. Необходимы дополнительные исследования, посвященные воздействию предоперационного стресса и некардиологической хирургической операции на миокард и мышечную работоспособность, а также рискам и пользе периоперационного лечения.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках Госзадания лаборатории патологии клетки НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского № 1023100400015-7-3.1.9.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все экспериментальные процедуры проводили согласно требованиям и международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, используемых для экспериментальных и научных целей. Исследование одобрено Комитетом по биоэтике Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения

“Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского” (протокол № 34 от 22 апреля 2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Botto F., Alonso-Coello P., Chan M.T. et al. Myocardial injury after noncardiac surgery: a large, international, prospective cohort study establishing diagnostic criteria, characteristics, predictors, and 30-day outcomes // *Anesthesiology*. 2014. V. 120. № 3. P. 564–578.
2. Vascular Events In Noncardiac Surgery Patients Cohort Evaluation (VISION) Study Investigators, Devereaux P.J., Chan M.T. et al. Association between postoperative troponin levels and 30-day mortality among patients undergoing noncardiac surgery [published correction appears in JAMA. 2012. V. 307. № 24. P. 2590] // *JAMA*. 2012. V. 307. № 21. P. 2295–2304.
3. Devereaux P.J., Xavier D., Pogue J. et al. Characteristics and short-term prognosis of perioperative myocardial infarction in patients undergoing noncardiac surgery: a cohort study // *Ann Intern Med*. 2011. V. 154. № 8. P. 523–528.
4. Cole G.D., Francis D.P. Perioperative β blockade: guidelines do not reflect the problems with the evidence from the DECREASE trials // *BMJ*. 2014. V. 349. P. g5210.
5. Üstünel F., Tura İ., Akçam AT et al. The Effect of Preoperative Fear of Pain on Postoperative Pain Levels and the Amount of Analgesic Consumption // *Pain Manag Nurs*. 2023. V. 24. № 6. P. 617–621.
6. Murgia M., Brocca L., Monti E., et al. Plasma proteome profiling of healthy subjects undergoing bed rest reveals unloading-dependent changes linked to muscle atrophy // *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2023. V. 14. № 1. P. 439–451.
7. Bautmans I, Van De Winkel N, Ackerman A. et al. Recovery of muscular performance after surgical stress in elderly patients // *Curr Pharm Des*. 2014. V. 20. № 19. P. 3215–3221.
8. Simental-Mendía L.E., Rodríguez-Morán M., Guerrero-Romero F. The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects // *Metab Syndr Relat Disord*. 2008. V. 6. № 4. P. 299–304.
9. Lie J.T., Holley K.E., Kampa W.R. et al. New histochemical method for morphologic diagnosis of early stages of myocardial ischemia // *Mayo Clin Proc*. 1971. V. 46. № 5. P. 319–327.
10. Серов Р.А., Чекарева Г.А., Рагузин К.К. и др. Применение окраски ГОФП – методом для выявления повреждений миокарда различного генеза // *Архив патологии*. 1977. Т. 34. В. 5. С. 70–72.
11. Sánchez-Íñigo L., Navarro-González D., Fernández-Montero A. et al. The TyG index may predict the development of cardiovascular events // *Eur J Clin Invest*. 2016. V. 46. № 2. P. 189–197.
12. Шиповская А.А., Ларина Н.А., Курбатова И.В. и др. Значение триглицерид-глюкозного индекса в диагностике инсулинорезистентности при ранних формах неалкогольной жировой болезни печени // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2021. Т. 194. № 10. С. 43–48.
13. Theodossiou A., Hu L., Wang N. et al. Autofluorescence Imaging to Evaluate Cellular Metabolism // *J Vis Exp*. 2021. V. 177. P. 10.3791/63282.
14. Georgakoudi I., Quinn K.P. Label-Free Optical Metabolic Imaging in Cells and Tissues // *Annu Rev Biomed Eng*. 2023. V. 25. P. 413–443.
15. Kondashevskaya M.V., Mikhaleva L.M., Artem'yeva K.A. et al. Unveiling the Link: Exploring Mitochondrial Dysfunction as a Probable Mechanism of Hepatic Damage in Post-Traumatic Stress Syndrome // *Int. J. Mol. Sci*. 2023. V. 24. № 13012. P. 2–26.

METABOLIC CHANGES IN THE MYOCARDIUM AND SKELETAL MUSCLES OF C57BLACK/6 MICE AFTER NON-CARDIOLOGICAL SURGERY

M. V. Kondashevskaya*, K. A. Artemyeva, V. V. Aleksankina, K. A. Kasabov,
and Corresponding Member of the RAS L.V. Kaktursky

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

*e-mail: marivladiko@mail.ru

It has been determined that approximately 10% of patients without cardiovascular disease undergoing non-cardiac surgery (NS) suffer myocardial injury (MI) and have a 10% risk of death within 30 days after Sur. Preoperative stress (PS) increases the risk of MI after NS (MINS). The mechanisms

of MINS are not well understood. The consequence of many NS is physical inactivity with the development of weakness and fatigue. To date, the relationship between NS and changes in the morphofunctional state of muscles in the postoperative period has been poorly studied. This study reveals for the first time, that metabolic and hormonal changes induced by PS+NS, as well as NS itself and inhalational anesthesia in C57BL/6 mice, are causal factors underlying the mechanisms of MINS in the postoperative period. It was also discovered for the first time, that even low values of the triglyceride-glucose index can indicate ischemic/hypoxic damage of the myocardium and skeletal muscles. Preoperative stress significantly impaired morphofunctional state of the studied organs. More research is needed on the effects of PS and NS on myocardium and muscle performance, as well as the risks and benefits of perioperative treatment.

Keywords: C57Black/6 mice, surgery, anesthesia, metabolic and hormonal changes, myocardial and skeletal muscle ischemia

УДК 616.995.132:902.2(571.121)

НАХОДКА ЯИЦ НЕМАТОДЫ *DIOSTOPHYME RENALE* (GOEZE, 1782) (NEMATODA, DIOSTOPHYMIDAE) НА СЕВЕРЕ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ В ПОЗДНЕМ ГОЛОЦЕНЕ

© 2024 г. Т. Н. Сивкова¹, П. А. Косинцев², *, В.В. Крапивина¹

Представлено академиком РАН В.В. Рожновым

Поступила в редакцию 15.07.2024 г.

После доработки 25.07.2024 г.

Принята к публикации 26.07.2024 г.

Проведен паразитологический анализ 29 образцов копролитов собак, грунта и навоза, полученных из культурного слоя городища Мангазея (66°42'с.ш., 82°16'в.д.), которое датируется 1601–1670-ми годами (конец позднего голоцена). В копролитах собак (*Canis familiaris* L., 1758) впервые на севере Западной Сибири обнаружены яйца нематоды *Dioctophyme renale* (Goeze, 1782), поражающей почки плотоядных. В настоящее время этот вид в составе гельминтофауны региона не отмечен. Гигантский свайник мог попасть в регион с собаками, которых привело русское население из европейской России в процессе освоения Сибири, однако, завоз гельминта не привел к формированию нового устойчивого природного очага диоктофимоза.

Ключевые слова: Западная Сибирь, голоцен, Средневековье, *Canis familiaris*, *Dioctophyme renale*, диоктофимоз, миграции, инвазия

DOI: 10.31857/S2686738924060033

Изучение ископаемых остатков гельминтов позволяет реконструировать историю формирования их современных ареалов [1–3]. Одним из механизмов их изменения являются миграции видов-хозяев, в том числе человека и сопутствующих ему домашних животных, с которыми происходил перенос паразитов [3]. Поэтому культурные слои древних поселений человека служат одним из основных источников информации о гельминтофауне прошлого. Одной из таких миграций людей является освоение русскими Сибири в XVI–XVII веках. Начало массовых миграций, в том числе возвратных (из Европейской части в Сибирь и обратно), приходится на начало XVII века и во многом связано с основанием в 1601 году на реке Таз города Мангазеи [4].

Задачей настоящей работы является описание находки яиц нематоды *D. renale* (Goeze, 1758) из культурного слоя городища Мангазея.

Городище Мангазея, оставшееся от города Мангазеи, расположено в Красноселькупском районе Ямало-Ненецкого автономного округа (ЯНАО) (66°42' с.ш., 82°16' в.д.). Оно находится в зоне лесотундры и распространения многолетней (“вечной”) мерзлоты. Люди населяли город Мангазею с 1601 по 1672 год, то есть в конце позднего голоцена. Раскапывалось городище в 2001–2004 годах [5]. Образцы для исследования получены из культурного слоя городища. Всего исследовано 29 образцов, в т.ч. навоз домашних копытных (4 образца), копролиты собак (24 образца) и грунт (1 образец). Средний вес образца составлял 2.85 ± 1.82 г. Палеопаразитологический анализ выполняли по общепринятой методике [6].

При палеопаразитологическом анализе 29 образцов в 26 пробах (89.66%) были обнаружены яйца различных гельминтов. Согласно морфологическим характеристикам среди обнаруженных паразитов установлены 2 вида трематод (*Opisthorchis felineus* – 16.67% и *Echinohasmus perfoliatus* – 45.83%), минимум 2 вида цестод (*Diphyllbothrium latum* – 83.33% и *Taenia sp.* – 8.33%) и 5 – нематод (*Trichuris sp.* – 25.0%; *Capillaria sp.* – 12.50%; *Toxocara canis* – 37.50%; *Dioctophyme renale* – 8.33% и *Ascaris lumbricoides* – 4.17%).

¹ ФГБОУ ВО Пермский государственный аграрно-технологический университет, г. Пермь, Россия

² Институт экологии растений и животных Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург, Россия

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

Особенный интерес представляет собой обнаружение яиц гигантского свайника *D. renale* (Goeze, 1782), которые отмечены в 2 копролитах собак. Данные яйца в количестве 5 имели длину 60–70 микрометров, вытянутую форму, с двумя пробочками на противоположных полюсах. Оболочка толстая имеет характерную орнаментацию и коричневатожелтый цвет (рис. 1). По морфологическим характеристикам обнаруженные яйца полностью соответствуют описаниям современных яиц данного вида [7]. Количество яиц диоктофимы в пересчете на 1 г образца оказалось невелико — 0.08, что недостаточно для выполнения генетического анализа.

Диоктофимоз — это гельминтоз, поражающий почечные лоханки около 49 видов хищных млекопитающих, в основном псовых, но отмечен также у кунных, кошачьих, тюленей, в редких случаях поражает человека и домашнюю свинью. Яйца нематоды выделяются во внешнюю среду с мочой и фекалиями [8, 9], после чего они должны попасть в воду. Яйца с развившейся внутри личинкой проглатывают промежуточные хозяева — олигохеты, в основном *Lumbriculus variegatus*, в котором личинки развиваются до инвазионности [8]. Паратеническими хозяевами диоктофим могут служить рыбы, в том числе щука (*Esox lucius* L., 1758), язь (*Leuciscus idus* L., 1758), плотва (*Rutilus rutilus* L., 1758), окунь (*Perca fluviatilis* L., 1758), а также некоторые амфибии [8]. Хищники, как и человек, заражаются или через олигохет, или в результате поедания паратенических хозяев. В организме дефинитивного хозяина личинки через брюшную полость мигрируют в почечную лоханку, где развиваются до половозрелого состояния [8].

Диоктофимоз считается редким гельминтозом, несмотря на то, что данная инвазия распространена по всему миру. В России его очаги существуют в центральных и северных районах Восточно-Европейской равнины, в Сибири и на Дальнем Востоке. Самыми северными районами его распространения являются Ленинградская, Архангельская области и Хабаровский край [8]. В Московской области природный очаг диоктофимоза насчитывает тысячи лет. Здесь яйца *D. renale* были найдены в копролитах собак из поселения позднего мезолита — раннего неолита (8000–7000 л.н.) [10]. В Ямало-Ненецком автономном округе случаев диоктофимоза у людей [9, 11], диких псовых и оленегонных собак на зафиксировано [12, 13]. Таким образом, гельминт *D. renale* в составе современной гельминтофауны ЯНАО не отмечен.

Находку яиц почечного гигантского свайника в культурном слое Мангазеи можно объяснить завозом его с собаками, так как основной поток мигрантов в Мангазею был из района Москвы и северных регионов России [14], где были и существуют природные очаги диоктофимоза. Из этих районов и были завезены инвазированные



Рис. 1. Яйцо *D. renale* из копролита собаки. Мангазея. Увел. x400.

собаки, в копролитах которых были найдены яйца гельминта.

Завоз гельминта в новый регион потенциально мог привести к образованию природного очага, для чего необходимо наличие окончательных и промежуточных хозяев и большого количества водоемов [15]. Район нахождения Мангазеи в зоне лесотундры соответствует этим условиям. Исследование костных остатков из раскопок Мангазеи показало, что ее население в значительных количествах вылавливало, употребляло в пищу и кормило собак потенциальными паратеническими хозяевами — щукой, язем, окунем; добывало дефинитивных хозяев — волка (*Canis lupus* L., 1758), лисицу (*Vulpes vulpes* L., 1758), песца (*Vulpes lagopus* L., 1758), росомуху (*Gulo gulo* L., 1758), соболя (*Martes zibellina* L., 1758), выдру (*Lutra lutra* L., 1758) [16]. В настоящее время здесь обитают промежуточные хозяева — более 6 видов олигохет, в том числе *Lumbriculus variegatus* [17]; паратенические хозяева — щука, язь, окунь, плотва и дефинитивные хозяева — волк, лисица, песец, росомуха, соболь, выдра, ласка (*Mustela nivalis* L., 1758), домашняя собака [16].

Таким образом, в бассейне реки Таз и конкретно в районе Мангазеи имелись предпосылки для формирования и существования природного очага диоктофимоза в результате инвазии гельминта с собаками из Восточной Европы. Но очаг не сформировался. Одной из причин этого может являться термический режим водоемов региона. Развитие личинки в яйце при температуре 15°C занимает 70–83 дня [18]. В регионе водоемы покрыты льдом в среднем 230–240 дней в году, средняя температура воды в них — ниже 10°C [19]. В этих условиях личинки не могли нормально развиваться.

Помимо этого, сыграло роль и небольшое количество инвазионного материала — малочисленность яиц *D. renale*, попавших в культурный слой.

Это подтверждает тот факт, что при проведении предыдущего гельминтологического анализа 55 образцов грунта и копролитов из культурного слоя Мангазеи, *D. renale* не найдена [20].

При исследовании копролитов собак из культурного слоя древнейшего русского города на севере Сибири — Мангазеи на реке Таз (ЯНАО), обнаружены яйца почечной нематоды — гигантского свайника *Diocetophyme renale* (Goeze, 1782). Зараженных животных переселенцы привезли с собой из районов Москвы, Великого Новгорода, Устюга, для которых диоктофимоз является природно-очаговым гельминтозом. В настоящее время этот паразит на территории ЯНАО не выявлен. В этом регионе есть все необходимые компоненты для формирования и функционирования природного очага диоктофимоза — окончательные и промежуточные хозяева и достаточное количество водоемов. Несмотря на это, инвазия гельминта не привела к формированию нового устойчивого природного очага диоктофимоза по причине неблагоприятных климатических условий и недостаточности инвазионного материала.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарим археологов Г.П. Визгалова и С.Г. Пархимовича за помощь в сборе образцов и музей Института экологии растений и животных УрО РАН за предоставленные образцы. Благодарим рецензента за замечания и рекомендации, которые позволили улучшить работу.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках темы госзадания Института экологии растений и животных УрО РАН № 122021000095-0.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хрусталева А.В., Савинцев А.Б. Использование гельминтологического анализа ископаемых экскрементов животных для палеоэкологических исследований // Экология. 1990. № 4. С. 83–85.
2. Araújo A., Ferreira L.F. Paleo-parasitology and the antiquity of human host-parasite relationships // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2000. V.5. Suppl. 1. P. 89–93.
3. Слепченко С.М. Археопаразитология — новый источник реконструкции миграций древнего населения: возможности, результаты и перспективы // Вестник археологии, антропологии и этнографии. 2021. № 3 (54) С. 147–162.
4. Миллер Г.Ф. История Сибири. М.: Восточная литература РАН; 1999. Т. I. 630 с.
5. Визгалов Г.П., Пархимович С.Г. Мангазея: новые археологические исследования (материалы 2001–2004 гг.). Екатеринбург–Нефтеюганск: Издательство Магеллан; 2008. 296 с.
6. Beltrame M.O., Sardella N.H., Fugassa M.H., Barberena R. A palaeoparasitological analysis of rodent coprolites from the Cueva Huelmo archaeological sites in Patagonia (Argentina) // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2012. V. 107. P. 604–608.
7. Ferreira V.L., Medeiros F.P., July J.R., Raso T.F. *Diocetophyma renale* in a dog: Clinical diagnosis and surgical treatment // Veterinary Parasitology. 2010. V. 168. P. 151–155.
8. Карманова Е.М. Диоктофимидеи животных и человека и вызываемые ими заболевания // Основы нематодологии. Т. 20. М.: Наука; 1968. 262 с.
9. Методы санитарно-паразитологической экспертизы рыбы, моллюсков, ракообразных, земноводных, пресмыкающихся и продуктов их переработки: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2015. 44 с.
10. Savinetsky A.B., Khrustalev A.V. Paleoparasitological investigations in Mongolia, Middle Asia and Russia // International Journal of Paleopathology. 2013. V. 3. P. 176–181.
11. Slepchenko S.M., Bugmyrin S.V., Kozlov A.I., Vershubskaya G.G., Shin D.H. Comparison of Helminth Infection among the Native Populations of the Arctic and Subarctic Areas in Western Siberia Throughout History: Parasitological Researches on Contemporary and the Archaeological Resources // Korean J. Parasitol. 2019. V. 57. N 6. P. 607–612.
12. Сивков Г.С., Сергушин А.В. Инвазионные болезни оленегонных собак и диких плотоядных Ямало-Ненецкого автономного округа. Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2008. № 4 (184). С. 96–99.
13. Сивкова Т.Н., Косинцев П.А. Обнаружение яиц токсокар в материале от собак из Наун-Пэ (Поллярный Урал) // Современные аспекты патогенеза, клиники, диагностики, лечения и профилактики паразитарных заболеваний: тр. XI Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием. Витебск: ВГМУ, 2019. С. 168–171.

14. Буцинский П.Н. Заселение Сибири и быт ее первых насельников. Тюмень: Издательство Ю. Мандрыки; 1999. 328 с.
15. Eiras J., Zhu X-Q., Yurlova N., Pedrassani D., Yoshikawa M., Nawa Y. 2021. *Diectophyma renale* (Goeze, 1782) (Nematoda, Dioctophymidae) parasitic in mammals other than humans: A comprehensive review // *Parasitology International*. V. 81. (Suppl. 1).
16. Визгалов Г.П., Кардаш О.В., Косинцев П.А., Лобанова Т.В. Историческая экология населения севера Западной Сибири. Нефтеюганск, Екатеринбург: Издательство АМБ; 2013. 376 с.
17. Степанов Л.Н. Влияние строительства газопровода на донную фауну водотоков бассейна р. Месояхи // Научный вестник Ямало-Ненецкого автономного округа. 2007. Выпуск № 6 (50), часть 1. С. 74–82.
18. Pedrassani D. et al. Morphology of eggs of *Diectophyma renale* Goeze, 1782 (Nematoda: Dioctophymatidae) and influences of temperature on development of first-stage larvae in the eggs // *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. — 2009. — Т. 18. — С. 15–19.
19. Бакулин В.В., Белецкая Н.П., Богданов В.Д. и др. Атлас Ямало-Ненецкого автономного округа. Омск: ФГУП “Омская картографическая фабрика”; 2004. 304 с.
20. Slepchenko S.M., Lobanova T.V., Vizgalov G.P., Ivanov S.N., Rakultseva D.S. Archaeoparasitological data and pathoecology of the town of Mangazeya in Western Siberia in the 17th century // *Journal of Archaeological Science: Reports*. 2021 (35).

FINDING EGGS OF THE NEMATODE *DIOCTOPHYME RENALE* (GOEZE, 1782) (NEMATODA, DIOCTOPHYMIDAE) IN THE NORTH OF WESTERN SIBERIA IN THE LATE HOLOCENE

T. N. Sivkova^a, P. A. Kosintsev^b, V. V. Krapivina^a

^a*Perm State Agro-Technological University, Perm, Russian Federation*

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

Presented by Academician of the RAS V.V. Rozhnov

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

A parasitological analysis was carried out on 29 samples of dog coprolites, soil and manure obtained from the cultural layer of the Mangazeya settlement (66°42'N, 82°16'E), which dates back to 1601–1670s (end of the late Holocene). For the first time in the north of Western Siberia, eggs of the nematode *Diectophyma renale* (Goeze, 1782), which infects the kidneys of carnivores, were found in coprolites of dogs (*Canis familiaris* L., 1758). Currently, this species is not recorded in the helminth fauna of the region. The giant kidney worm could have entered the region with dogs brought by the Russian population from European Russia during the development of Siberia, however, the introduction of the helminth did not lead to the formation of a new stable natural focus of dioctophymiasis.

Keywords: Western Siberia, Holocene, Middle Ages, *Canis familiaris*, *Diectophyma renale*, dioctophymiasis, migration, infection

УДК 569.742.1:551.793(477.75)

ЭТРУССКИЙ ВОЛК *CANIS ETRUSCUS* (CANIDAE, CARNIVORA) ИЗ РАННЕГО ПЛЕЙСТОЦЕНА КРЫМА (ПЕЩЕРА ТАВРИДА)

© 2024 г. А. В. Лавров¹, М. В. Сотникова², Д. О. Гимранов^{3, *},
Х. Мадурелл-Малапейра⁴, академик РАН А. В. Лопатин¹

Поступило 29.07.2024 г.

После доработки 15.08.2024 г.

Принято к публикации 17.08.2024 г.

Из раннеплейстоценового местонахождения в пещере Таврида (возраст около 1.5–1.8 млн лет) в Крыму описаны фрагменты челюстей среднеразмерного представителя псовых, включенные в гиподигм вида *Canis etruscus* Forsyth Major, 1877, обычного хищника поздневиллафранкской фауны Средиземноморья. Из Северного Причерноморья этот вид описан впервые. Изученные находки подтверждают ранее высказанное предположение о периодическом использовании пещеры Таврида в качестве логова и убежища псовыми и другими крупными хищниками.

Ключевые слова: *Canis etruscus*, ранний плейстоцен, пещера Таврида, Крым, премоляры, моляры, эволюция

DOI: 10.31857/S2686738924060049

В пещере Таврида найдены многочисленные остатки представителей Carnivora: Canidae, Ursidae, Felidae, Nyaenidae и Mustelidae [1–4]. Все находки соответствуют фауне позвоночных позднего виллафранка Западной Европы (псепкупский фаунистический комплекс юга России, около 1.8–1.5 млн л.н.) [1]. Изученные остатки Canidae были обнаружены в южном коридоре пещеры, на расстоянии до 200 м от древнего природного входа (который находился на склоне долины р. Фундукла). Через этот горизонтальный коридор древние хищники проникали в пещеру, которую они использовали как логово. Кости копытных, найденные в пещере, являются продуктом охоты этих животных [5].

Среди находок представителей Canidae в пещере наиболее часто встречаются кости волка средних размеров, который был мельче современного *Canis*

lupus Linnaeus, 1758. Появление рода *Canis* Linnaeus, 1758 в Западной Европе долгое время считалось биохронологическим маркером начала позднего виллафранка (около 2.0 млн л.н.) и было названо “wolf-event” [6–8]. В дальнейшем было показано, что первое появление рода *Canis* в Европе имело место еще в среднем виллафранке, в фаунистическом комплексе Коста-Сан-Джакомо (около 2.2 млн л.н.); поэтому для маркировки начала позднего виллафранка было предложено использовать термин “*Pachycrocuta*-event” [7]. Современные исследования указывают на диахронный характер расселения наиболее массовых форм крупных млекопитающих при переходе от среднего к позднему виллафранку. Это привело к переоценке биохронологического значения событий, основанных только на одном таксоне, таких как “wolf-event” и “*Pachycrocuta*-event” [8].

Тем не менее отказ от термина “wolf-event” не отменил большого событийного значения адаптивной радиации *Canis*. Наиболее ярко увеличение видового разнообразия рода в Европе проявилось в калабрии (около 1.8–0.8 млн л.н.). Из этого интервала из разных местонахождений Европы описаны следующие виды: *Canis etruscus* Forsyth Major, 1877; *C. arnensis* Del Campana, 1913; *C. mosbachensis* Soergel, 1925; *C. senezensis* Martin, 1973; *C. apolloniensis* Koufos et Kostopoulos, 1997; *C. accitanus* Garrido et Arribas, 2008; *C. borjgali* Bartolini Lucenti et al., 2020; *C. orcensis* Martínez-Navarro et al., 2021. В последнее время *C. senezensis* и *C. accitanus* стали

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

²Геологический институт Российской академии наук,
Москва, Россия

³Институт экологии растений и животных
Уральского отделения Российской академии наук,
Екатеринбург, Россия

⁴Факультет наук о Земле, Флорентийский университет,
Флоренция, Италия

*e-mail: djulfa250@rambler.ru

рассматриваться как младшие субъективные синонимы *C. arnensis* [9]. Диагноз *C. apolloniensis* (Аполлония, Греция, конец позднего виллафранка или эпивиллафранк) сформулирован недостаточно четко. Возможно, в этом таксоне объединены две формы рода *Canis*: более мелкий представитель группы *C. arnensis* и более крупный *C. ex gr. etruscus-mosbachensis*. Так, по мнению Г. Куфоса [10] и нашим наблюдениям, верхние моляры более крупных экземпляров *Canis* из Аполлонии демонстрируют признаки, сходные с таковыми *C. mosbachensis*, но не *C. etruscus*. Учитывая результаты последних таксономических ревизий, в данной работе мы приводим сравнение с широко распространенными таксонами (*C. etruscus*, *C. arnensis*, *C. mosbachensis*). Особое внимание уделяется недавно описанным видам *C. borjgali* из Дманиси (Грузия, 1.85–1.77 млн л.н.) и *C. orcensis* из Вента-Мисены (Испания, 1.6–1.5 млн л.н.), которые мы считаем валидными на основании четко детерминированных видовых признаков.

Изученный материал из пещеры Таврида хранится в Палеонтологическом институте им. А.А. Борисяка РАН (ПИН), Москва, Россия. Он представлен двумя фрагментами верхнечелюстных костей от двух взрослых особей (экз. ПИН,

№№ 5644/347 и 348; сборы 2020 г., Южный коридор) и неполной ветвью нижней челюсти с m1 и m2, затронутыми стиранием (экз. ПИН, № 5644/349; сборы 2018 г., точка “Логово гиен”).

Для сравнения использованы материалы из типовых серий *Canis etruscus* и *C. arnensis* из коллекции Отделения геологии и палеонтологии Музея естественной истории Университета Флоренции (IGF), Италия. Кроме того, исследованный материал сравнивался с черепом *C. etruscus* экз. IGF 12334 (по слепку в коллекции Геологического института РАН, Москва, Россия). Этот образец был выделен Д. Торре в качестве лектотипа *C. etruscus* ([11], табл. X, экз. МСМ 47; в настоящее время экз. IGF 12334, см. [12], рис. 67В–Е). Были проанализированы материалы из Унтермасфельда в Германии (Научно-исследовательская станция четвертичной палеонтологии (IQW), Веймар) [13], а также экземпляры *C. borjgali* из Дманиси в Грузии (Национальный музей Грузии (GNM), Тбилиси), лично изученные авторами (М.С. и Х.М.-М.).

Представители рода *Canis* имеют высокий уровень морфометрической изменчивости (характерно для видов с обширным ареалом). Поэтому в исследовании были использованы принятые устойчивые одонтологические видовые признаки

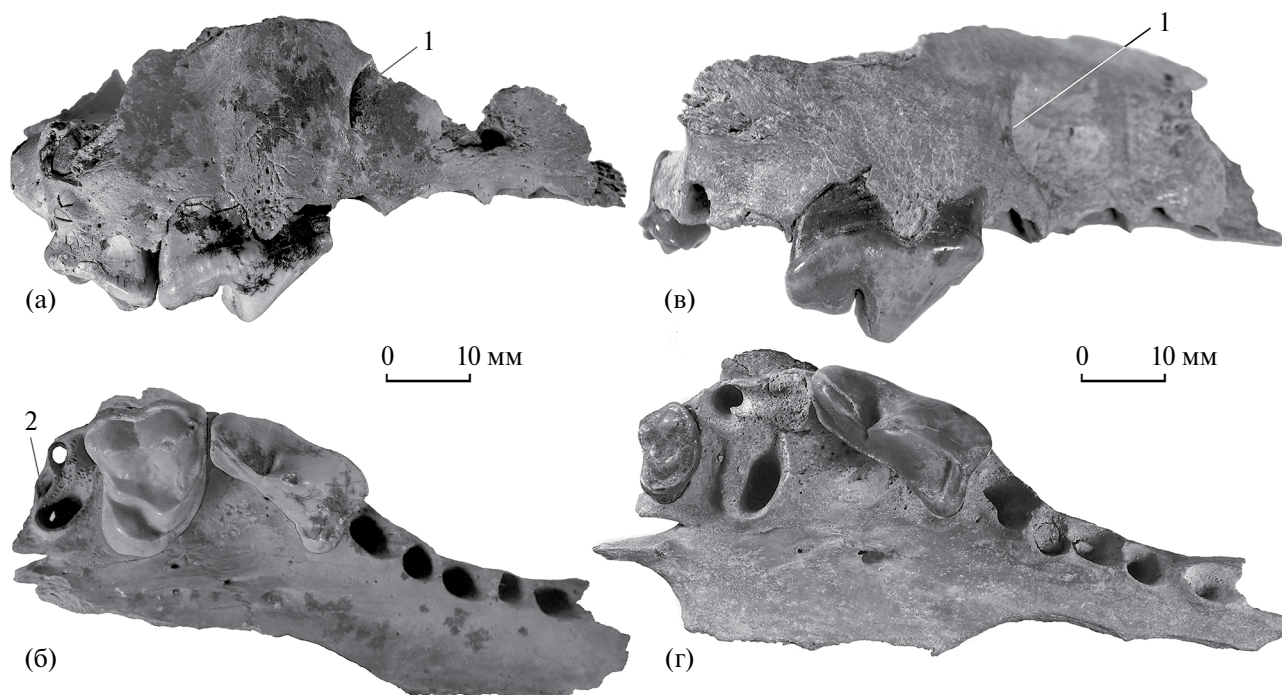


Рис. 1. *Canis etruscus* Forsyth Major, 1877: а, б — экз. ПИН, № 5644/347, правая верхнечелюстная кость с Р4–М1, альвеолами С1–Р3 и М2: а — с буккальной стороны; б — с окклюзионной стороны; в, г — экз. ПИН, № 5644/348, правая верхнечелюстная кость с Р4 и М2, альвеолами С1–Р3 и М1: в — с буккальной стороны; г — с окклюзионной стороны; Россия, Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен. Обозначения: 1 — подглазничное отверстие; 2 — альвеола каудального (четвертого) корня М2.

C. etruscus [9, 11–17], дополненные нашими собственными наблюдениями.

Промеры выполнены по стандартным схемам и даны в мм. Обозначения: Hm1 – высота ветви нижней челюсти под m1; Hm1/m2 – высота ветви нижней челюсти между m1 и m2; Hp2/p3 – высота ветви нижней челюсти между p2 и p3; L – длина; Lmtst – длина метастиллярной доли P4; Lta – длина талонида; Ltr – длина тригонида; W – ширина; Wpa – ширина зуба в области паракона.

Фрагмент правой верхнечелюстной кости экз. ПИН, № 5644/347 (рис. 1а, 1б) содержит целые P4 и M1, частично сохранившуюся альвеолу C1 и альвеолы P1–P3 и M2. Размеры: LP1–M2 – 73.4; LP1–P4 – 55.8; LM1–M2 – 25.6. Фрагмент правой верхнечелюстной кости экз. ПИН, № 5644/348 (рис. 1в, 1г) включает P4, M2 и альвеолы P1–P3 и M1. Подглазничное отверстие расположено над задним корнем P3. Размеры: LP1–M2 – 77.3; LP1–P4 – 59.4; LM1–M2 – 24.5. Размеры верхних зубов приведены в табл. 1.

На экз. ПИН, №№ 5644/347 и 348 клык и премоляры не разделены диастемами; диастема (L – 3.0) имеется между P1 и P2 у экз. ПИН, № 5644/347. У *C. arnensis* диастемы между премолярами имеются всегда. У *C. etruscus* эти диастемы присутствуют у большинства экземпляров, у *C. mosbachensis* этот признак сильно варьирует. Оба P4 имеют прямой буккальный край в окклюзиальной проекции. Передний край P4 имеет слабо выраженную выемку между параконем и протоконом. Передние края протокона и паракона расположены на одной линии, как у *C. arnensis* и большинства экземпляров *C. etruscus*. Паракон массивный, он имеет хорошо выраженный мезиальный режущий гребень. Выступ протокона отчетливый и несет выраженный конус, в отличие от *C. orcanensis* и *C. lupus*. Этот конический бугорок имеет два гребня – букколингвальный и дистальный. На экз. ПИН, № 5644/347 букколингвальный гребень протокона не доходит до мезиального гребня паракона, в отличие от экз. ПИН, № 5644/348 (рис. 1б, 1г). Мезиальный и лингвальный цингуломы на обоих образцах выражены хорошо, как у *C. arnensis* и *C. etruscus*. У *C. mosbachensis* мезиолингвальный цингулом протокона развит слабо, а у *C. lupus* он отсутствует. На обоих описываемых образцах лингвальный цингулом не имеет разрыва у заднего края

протокона, что соответствует *C. etruscus* и контрастирует с *C. mosbachensis* и *C. lupus*.

Бассейн тригона на M1 (экз. ПИН, № 5644/347) больше бассейна гипокона. Оба бассейна относительно глубокие, как у *C. etruscus*, в противоположность более мелким бассейнам у *C. lupus* и *C. borjgali* (экз. GNM, D 1126). Паракон больше метакона по высоте и площади, однако разница в их высоте небольшая. Эти бугорки ниже, чем у *C. mosbachensis* и *C. lupus*. Зуб широкий мезиодистально, парастиль хорошо развит, но его размер меньше, чем у лектотипа *C. etruscus* (IGF 12334). Задний край зуба на экз. ПИН, № 5644/347 имеет слабый прогиб (флексус). У *C. mosbachensis* и *C. lupus* этот флексус развит сильнее. Внутренний гребень паракона (гипопаракриста) развит хорошо, как у *C. arnensis* и *C. etruscus*. Этот гребень меньше выражен у *C. mosbachensis*, *C. orcanensis* и *C. borjgali* и полностью отсутствует у *C. lupus*. У волка из Тавриды мезиодистальное сужение в центральной части коронки M1 отсутствует, как у *C. etruscus* и *C. arnensis*. При этом у *C. mosbachensis* сужение зуба более заметно, а у *C. lupus* этот признак варьирует. На образце из пещеры Таврида у M1 протокон крупный, метаконуль гребневидный, параконуль слабо выражен. Дистальный гребень метаконуля соединяется с постцингулюмом. Это соответствует признакам *C. etruscus*. У *C. mosbachensis* и *C. borjgali* метаконуль больше похож на бугорок. У экз. ПИН, № 5644/347 мезиолингвальный цингулом M1 развит в виде широкой полки и переходит в прегипокристу без разрыва, как у *C. etruscus*. Этот цингулом на M1 у *C. orcanensis*, *C. mosbachensis* и *C. borjgali* также не имеет разрыва, но выражен гораздо слабее. У *C. lupus* на этом месте мезиолингвальный цингулом отсутствует.

M2 присутствует только на экз. ПИН, № 5644/348 (рис. 1в, 1г). На экз. ПИН, № 5644/347 от M2 имеется только альвеола с каналами четырех корней, что необычно для рода. M2 на экз. ПИН, № 5644/348 также четырехкорневой. M2 в окклюзиальной проекции имеет более широкие и округлые очертания, без выраженного изгиба заднего края, в отличие от *C. mosbachensis*. Форма этого зуба идентична M2 *C. etruscus* из Оливолы (экз. IGF 4411) и Панталлы (Италия; см. [16], рис. 5а, 5б) и близка к форме M2 лектотипа *C. etruscus*.

У экз. ПИН, № 5644/348, как и у большинства *C. etruscus* (например, экз. IGF 4411 из Оливолы),

Таблица 1. Размеры верхних щечных зубов *Canis etruscus* Forsyth Major, 1877, экз. ПИН, №№ 5644/347 и 348; Россия, Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен (L – длина; W – ширина)

Экз. ПИН, №	P1		P2		P3		P4		M1		M2	
	L	W	L	W	L	W	L	W	L	W	L	W
5644/347	7.4*	4.7*	11.6*	4.7*	13.8*	4.8*	20.8	11.8	15.0	19.6	8.6*	12.7*
5644/348	7.5*	4.6*	13.5*	4.5*	16.0*	5.6*	23.3	13.1	14.5*	19.5*	7.6	11.9

* – измерения по альвеолам.

буккальные края М1–М2 расположены на одной линии. Следует заметить, что М2 у *C. lupus* смещен лингвально относительно буккального края М1 и этот признак редко присутствует у *C. mosbachensis* из Унтермасфелда. Буккальный цингулюм М2 хорошо развит и переходит на заднюю часть коронки, как и у других *C. etruscus*. Буккальные бугорки низкие и широко расставленные; по высоте и площади паракон больше метакона. Внутренний гребень паракона хорошо выражен в базальной части. Протокон крупный, высокий. Метаконуль выражен в виде гребня постпротокрысты, как у *C. etruscus* и у *C. borjgali*. У *C. arnensis*, напротив, метаконуль выражен как бугорок. У *C. mosbachensis* метаконуль и постпротокрыста М2, как правило, отсутствуют. Постцингулюм хорошо развит вокруг всей задней части зуба. Площади бассейнов тригона и гипокона на М2 у волка из Тавриды равны, как у *C. etruscus*. У *C. mosbachensis* и *C. borjgali* бассейн тригона М2 по площади больше, чем бассейн гипокона.

Правая ветвь тела нижней челюсти с р3–м3 и альвеолами с1–р2 (экз. ПИН, № 5644/349; рис. 2) принадлежит взрослой особи с умеренно стертыми зубами. Высота ветви постепенно уменьшается в переднем направлении (Hm1/m2 – 25.9; Hm1 – 27.9; Hp2/p3 – 21.0). Сохранилось одно крупное подбородочное отверстие под передним корнем р2. Все зубы плотно прилегают друг к другу, диастема (L – 1.8) имеется только между р3 и р4. Длина зубных рядов: Lp1–м3 – 84.6; Lp1–р4 – 46.2; Lm1–м3 – 39.4. В буккальной проекции все основания коронок премоляров находятся на одном уровне с базальной линией основания коронки m1 (признак, характерный преимущественно для самых ранних представителей рода *Canis* – *C. etruscus* и *C. arnensis*). В окклюзионной проекции небольшой букколингвальный изгиб зубного ряда имеется между р4 и m1. При этом задний край р4 кулисообразно перекрывает передний край m1, подобно *C. etruscus* (лектотип IGF 12334). Напротив, у голотипа *C. arnensis* (IGF 869) зубной ряд прямой, перекрытие коронок р4 и m1 отсутствует.

Альвеола однокорневого р1 плотно примыкает к альвеоле клыка. Коронки р2–р4 букколингвально узкие и слегка асимметричные, с хорошо развитыми гребнями (кристидами). У р3 в окклюзионной проекции лингвальный край почти прямой, добавочный бугорок отсутствует, постцингулид развит

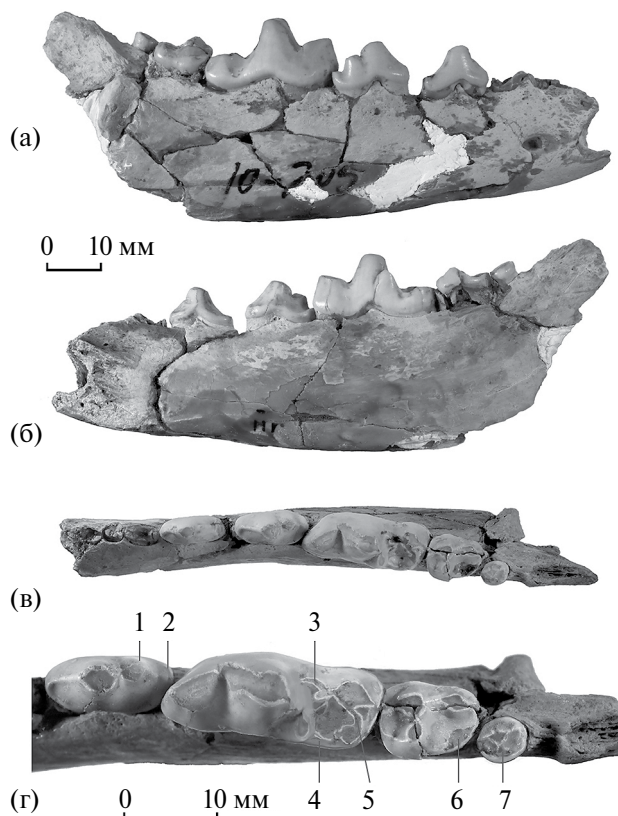


Рис. 2. *Canis etruscus* Forsyth Major, 1877, экз. ПИН, № 5644/349, правая ветвь тела нижней челюсти с р3–м3 и альвеолами с1–р2: а – с буккальной стороны; б – с лингвальной стороны; в – с окклюзионной стороны; г – р4–м3 с окклюзионной стороны; Россия, Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен. Обозначения: 1 – первый добавочный бугорок р4; 2 – второй добавочный бугорок р4; 3 – протостилид m1; 4 – мезоконид m1; 5 – гипокристин (трансверсальный гребень) m1; 6 – энтоконид m2; 7 – метаконид m3.

в виде отчетливого заднего валика, лингвальный цингулид слабый (как на лектотипе IGF 12334). На р4 первый задний добавочный бугорок крупный; второй добавочный бугорок развит в виде четкого гребнеобразного поднятия, отделенного от постцингулида (рис. 2г). Лингвальный цингулид развит умеренно вдоль всего края коронки; буккальный цингулид выражен слабо.

На m1 метаконид крупный, хорошо обособлен. Его вершина смещена дистальнее протокониды

Таблица 2. Размеры нижних щечных зубов *Canis etruscus* Forsyth Major, 1877, экз. ПИН, № 5644/349; Россия, Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен (L – длина; W – ширина)

p1		p2		p3		p4		m1		m2		m3	
L	W	L	W	L	W	L	W	L	W	L	W	L	W
5.9*	3.5*	10.7*	4.1*	12.5	5.3	14.2	6.6	25.1	9.5	10.4	8.5	5.2	4.7

* – измерения по альвеолам.

и отклонена лингвально относительно дорсовентральной оси зуба (соответствует морфологии *C. etruscus*, в частности, лектотипу IGF 12334). Задний гребень метаконид (метакристид) выражен только у его основания, где он соединяется с передним гребнем энтоконид (рис. 2г). В отличие от большинства *C. etruscus*, у описанного образца из Крыма перед энтоконидом находится небольшой мезоконид, который замыкает бассейн талонида лингвально, как у *C. orcensis* и большинства образцов *C. mosbachensis*. Так же как у большинства *C. etruscus*, у образца из Тавриды имеется хорошо выраженный протостилид в мезиобуккальной части талонида. Ширина талонида m1 составляет около 95% от ширины тригонид. Буккальный флексид не выражен (в отличие от *C. mosbachensis* и *C. lupus*), на талониде хорошо развит гипокристид (трансверсальный гребень [12]), соединяющий гипоконид и энтоконид. Основание гипоконида существенно шире основания энтоконид. Лингвальный цингулид слабый, выражен от линии вершины метаконида до заднего края коронки; слабый лингвальный цингулид имеется также в основании параконида.

Коронка m2 имеет субпрямоугольные очертания, короткий и широкий талонид с двумя четкими бугорками (рис. 2г). Параконид гребневидный, протоконид и метаконид расположены на одной поперечной линии. Ширина талонида составляет примерно 88% от ширины тригонид. Гипоконид крупный, энтоконид в виде низкого бугорка. Мезиобуккальный цингулид и дистобуккальный цингулид (под гипоконидом) развиты очень хорошо (плезиоморфный признак). Очертания зуба в окклюзиальной проекции и наличие двух бугорков на талониде соответствуют морфологии m2 в типовой серии *C. etruscus*. У *C. mosbachensis*, *C. borjgali* и *C. orcensis* в отличие от *C. etruscus* талонид сужается дистально. У первых трех видов вместо дисталинговального бугорка (энтоконид), характерного для *C. etruscus*, часто развито гребнеобразное поднятие (в частности, у экз. D-1, D-646, D-2917 и др. *C. borjgali* из Дманиси и у большинства *C. mosbachensis* из Унтермасфельда) [13].

Последний нижний моляр m3 смещен лингвально от продольной оси зубного ряда. Благодаря наличию развитого талонидного бассейна он имеет эллиптическую форму в окклюзиальной проекции. Цингулид развит по всему периметру зуба. Главный бугорок (протоконид) смещен буккально, имеет передний и задний гребни, ориентированные мезиодистально. Лингвальнее протоконид, на одной поперечной оси с ним, расположен небольшой хорошо выраженный метаконид. Лингвальная сторона метаконида соединена с цингулидом. У *C. mosbachensis* метаконид m3 развит гораздо слабее, у *C. lupus* на m3 имеется только один бугорок, расположенный в центре зуба. У *C. borjgali* на m3 имеются два отчетливых бугорка (протоконид крупнее), соединенных

гребнями, но очертания зуба более округлые, чем у *C. etruscus*. Кроме того, у *C. etruscus*, *C. lupus* и *C. mosbachensis* цингулид имеется вокруг всего m3 (у *C. borjgali* только прецингулид и постцингулид).

В Европе первая половина калабрия (около 1.8–1.2 млн л.н.) была временем климатической стабильности, характеризующимся преобладанием открытых обстановок и несколькими фазами аридизации, которые предшествовали нелинейной фазе ледниковой цикличности со значительной амплитудой и асимметрией, которая началась приблизительно 1.2 млн л.н., ознаменовав переход от раннего к среднему плейстоцену ("Early-Middle Pleistocene Transition"). Представители трибы Canini в это время получили большое распространение, сопровождавшееся необычайным увеличением биоразнообразия отмеченных таксонов, связанных с открытыми ландшафтами. Обычно считается, что в это время произошло первое расселение в Европе трех основных групп псовых: среднемерных волкоподобных форм (*C. etruscus* и *C. mosbachensis*), шакалоподобных *C. arnensis* и крупных форм с признаками зубной гиперкарниворной специализации, представленных родом *Xenocyon* Kretzoi, 1938.

C. orcensis из Вента-Мисены и *C. borjgali* из Дманиси не отличаются по размерам от других волкоподобных форм [18, 19]. Два последних вида основаны на описании серии находок из единичных местонахождений, поэтому сравнение с этими таксонами в данной работе носит предварительный характер, в отличие от *C. etruscus* и *C. mosbachensis*, находки которых известны из множества европейских местонахождений. Морфологический анализ *C. etruscus* из классических европейских местонахождений указывает на относительно высокую внутривидовую изменчивость. Основная тенденция развития гипокарниворной специализации у всего гиподигма *C. etruscus* хорошо выражена [11, 12, 15–17].

Проведенный нами анализ показал, что экземпляры из пещеры Таврида по размерам и морфологическим признакам (в частности, признакам, связанным с развитием гипокарнивории) относятся к виду *C. etruscus*. На нижних зубах у волка из Крыма признаки гипокарнивории включают: мощный и отклоненный лингвально метаконид, хорошо развитый протостилид на m1; мезиодистально длинный и букколингвально широкий m2 с субквадратными очертаниями коронки и развитой областью энтоконид с отчетливым бугорком; пропорционально довольно крупный эллипсовидный m3 с развитым талонидным бассейном. На верхних зубах к гипокарниворным признакам можно отнести: букколингвально широкие и относительно низкие коронки M1–M2, которые практически лишены задних флексусов и имеют скорее субквадратные, чем субтреугольные очертания; развитый выступ протокона P4 с хорошо

выраженным конусом протокона. Следует отметить наличие четырех корней на М2 у описанной формы из пещеры Таврида — это редко проявляющийся признак у *Canis*. Он косвенно указывает на тенденцию гипокарниворного направления в развитии моляров. Сравнение с другими видами — *C. orcensis*, *C. mosbachensis*, *C. borjgali*, дает основание полагать, что развитие этих форм было типичным для времени адаптивной радиации данной группы волкоподобных форм, которые формировали промежуточные признаки, направленные в сторону развития волков группы *C. lupus*, появившейся в среднем плейстоцене.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность всем участникам раскопок в пещере Таврида. Авторы благодарят Г.В. Самохина и Б.А. Вахрушева (Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь) за помощь в организации и проведении экспедиционных работ в пещере Таврида. М.В. Сотникова благодарна Л. Руку (L. Rook, IGF) и Р. Кальке (R.-D. Kahlke, IQW) за возможность изучения коллекций. Авторы выражают признательность покойным ныне А.К. Векуа (A.K. Vekua, GNM) — за предоставленный доступ к материалу по Canidae из Дманиси, и Д. Торре (D. Torre, IGF) — за слепки образцов из типовых серий *C. etruscus* и *C. arnensis*.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00214, <https://rscf.ru/project/22-14-00214/>. М.В. Сотниковой изучение морфологии и эволюции Canidae проводилось в соответствии с планом научных работ Геологического института РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследовались ископаемые материалы. Работы с живыми животными не проводились.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

У авторов нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Лавров А.В., Хантемуров Д.Р., Гимранов Д.О., Лопатин А.В. *Chasmaporthetes lunensis* (Hyaenidae, Carnivora) из раннего плейстоцена Крыма // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2022. Т. 507. С. 441–444.
3. Gimranov D., Lavrov A., Prat-Vericat M. et al. *Ursus etruscus* from the late Early Pleistocene of the Taurida cave (Crimean Peninsula) // Historical Biology. 2023. V. 35. № 6. P. 843–856.
4. Гимранов Д.О., Цзянцзю Ц., Лавров А.В., Лопатин А.В. *Mustela strandi* (Mustelidae, Carnivora) из раннего плейстоцена Крыма // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2023. Т. 513. С. 528–532.
5. Оксиденко П.В., Лавров А.В. История формирования пещеры Таврида — памятника фауны позвоночных позднего виллафранка и ее палеонтологическое значение // Вестник МГУ. Сер. 5. Геогр. 2021. № 1. С. 27–42.
6. Azzaroli A. Quaternary mammals and the “end-Villafranchian” dispersal event — a turning point in the history of Eurasia // Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology. 1983. V. 44. № 1–2. P. 117–139.
7. Martínez-Navarro B. Early Pleistocene faunas of Eurasia and hominin dispersals. In: Out of Africa I: The first hominin colonization of Eurasia / Eds Fleagle J.G., Shea J.J., Grine F.E. et al. Dordrecht: Springer, 2010. P. 207–224.
8. Iannucci A., Mecozzi B., Sardella R. Beware of the “Wolf event” — remarks on large mammal dispersals in Europe and the Late Villafranchian faunal turnover // Alpine and Mediterranean Quaternary. 2023. V. 36. № 1. P. 75–90.
9. Brugal J.-P., Boudadi-Maligne M. Quaternary small to large canids in Europe: taxonomic status and biochronological contribution // Quaternary International. 2011. V. 243. № 1. P. 171–182. <https://doi.org/10.3390/quat1010006>
10. Koufos G.D. New material and revision of the Carnivora, Mammalia from the Lower Pleistocene locality Apollonia 1, Greece // Quaternary. 2018. V. 1. № 1. Art. 6. P. 1–38.
11. Torre D. I cani villafranchiani della Toscana // Palaeontographia Italica. 1967. V. 63. P. 113–138.
12. Tedford R.H., Wang X., Taylor B.E. Phylogenetic systematics of the North American fossil Caninae (Carnivora: Canidae) // Bulletin of the American Museum of Natural History. 2009. № 325. P. 1–218.
13. Sotnikova M.V. Remains of Canidae from the Lower Pleistocene site of Untermassfeld // Monographien des Römisch-Germanisches Zentralmuseum. 2001. V. 40. P. 607–632.
14. Del Campana D. I cani pliocenici di Toscana // Palaeontographia Italica. 1913. V. 19. P. 189–254.

15. *Sotnikova M., Rook L.* Dispersal of the Canini (Mammalia, Canidae: Caninae) across Eurasia during the Late Miocene to Early Pleistocene // *Quaternary International*. 2010. V. 212. № 2. P. 86–97.
16. *Cherin M., Bertè D.F., Rook L., Sardella R.* Re-defining *Canis etruscus* (Canidae, Mammalia): a new look into the evolutionary history of Early Pleistocene dogs resulting from the outstanding fossil record from Pantalla (Italy) // *Journal of Mammalian Evolution*. 2014. V. 21. P. 95–110.
17. *Bartolini Lucenti S., Rook L.* A review on the Late Villafranchian medium-sized canid *Canis arnensis* based on the evidence from Poggio Rosso (Tuscany, Italy) // *Quaternary Science Reviews*. 2016. V. 151. P. 58–71.
18. *Bartolini Lucenti S., Bukhsianidze M., Martínez-Navarro B., Lordkipanidze D.* The wolf from Dmanisi and augmented reality: review, implications, and opportunities // *Frontiers of Earth Science*. 2020. V. 8. Art. 131. P. 1–13.
<https://doi.org/10.3389/feart.2020.00131>
19. *Martínez-Navarro B., Bartolini Lucenti S., Palmqvist P. et al.* A new species of dog from the Early Pleistocene site of Venta Micena (Orce, Baza Basin, Spain) // *Comptes Rendus Palevol*. 2021. V. 20. Art. 17. P. 297–314.

ETRUSCAN WOLF *CANIS ETRUSCUS* (CANIDAE, CARNIVORA) FROM THE EARLY PLEISTOCENE OF CRIMEA (TAURIDA CAVE)

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

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

^b*Geological Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

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

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

*e-mail: djulfa250@rambler.ru

The cranial and mandibular fragments of the medium-sized canid from the Early Pleistocene locality of Taurida cave (about 1.8–1.5 Ma) in Crimea are described and included in the hypodigm of the species *Canis etruscus* Forsyth Major, 1877, a common member of the Late Villafranchian fauna of the Circum-Mediterranean region. This species is reported for the first time from the Northern Black Sea region. The discovered evidence reinforce previous published idea regarding the periodically use of the Taurida cave by canids and other large predators as a den and shelter.

Keywords: *Canis etruscus*, Early Pleistocene, Taurida cave, Crimea, premolars, molars, evolution

УДК 577.22

РАЗВИТИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У ПРОБИОТИЧЕСКОГО ШТАММА *LACTIPLANTIBACILLUS* *PLANTARUM* 8P-A3 СОПРОВОЖДАЕТСЯ ИЗМЕНЕНИЯМИ СТРУКТУРЫ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ И ХАРАКТЕРА ИХ ВЛИЯНИЯ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ

© 2024 г. О. А. Чернова¹, А. Р. Каюмов^{2, *}, М. И. Маркелова^{1, 2}, В. В. Сальников¹,
М. П. Кутырева², А. А. Ханнанов², М. С. Федорова², Д. Э. Журавлева², Н. Б. Баранова^{1, 2},
Д. А. Файзуллин, Ю. Ф. Зуев¹, В. М. Чернов¹

Представлено академиком А.Н. Гречкиным

Поступило 15.07.2024 г.

После доработки 15.08.2024 г.

Принято к публикации 17.08.2024 г.

Впервые показано, что развитие резистентности к антибиотикам (амоксиклину и кларитромицину) *in vitro* у пробиотического штамма *Lactiplantibacillus plantarum* 8p-a3, ассоциированное с крупномасштабными геномными перестройками, изменением профиля фенотипической чувствительности к антимикробным препаратам разных групп и эволюцией вирулентности, сопровождается также существенными изменениями внеклеточных мембранных везикул лактобациллы, транспортирующих липиды, полисахариды, белки и нуклеиновые кислоты. Изменения связаны со структурой и составом везикул, а также их активностью в отношении биопленок условно-патогенных бактерий. Полученные данные актуальны для понимания молекулярных механизмов выживания микроорганизмов в условиях селективного давления антимикробных препаратов, функционального потенциала везикул пробиотиков и оценки их безопасности.

Ключевые слова: пробиотические бактерии, антибиотикорезистентность, внеклеточные везикулы, структура и функции, протеом, бактериальные биопленки

DOI: 10.31857/S2686738924060059

ВВЕДЕНИЕ

Обнаружение везикулярного трафика у представителей всех доменов жизни открыло не только новые направления фундаментальных исследований механизмов межклеточной коммуникации и адаптации живых систем, но перспективы практического применения внеклеточных везикул бактерий в качестве новых типов вакцин, иммуномодуляторов, антимикробных препаратов и способов их доставки [1–3]. Особые надежды связывают

с везикулами бактерий-комменсалов, имеющих статус GRAS, широко используемых в медицине, сельском хозяйстве и биотехнологии в качестве пробиотиков [4–6]. Возможности крупномасштабных геномных перестроек и эволюции вирулентности, а также изменения везикулярного *cargo* у бактерий в условиях селективного давления [7–11] определяют актуальность анализа структурно-функциональных характеристик везикул, продуцируемых пробиотическими бактериями в разных условиях среды. Получение таких данных необходимо как для понимания молекулярных механизмов выживания комменсалов в стрессовых условиях, так и оценки безопасности пробиотиков и их наноструктур, нацеленных на практические приложения. Пул сообщений относительно выявления полезных свойств у везикул пробиотических бактерий растет [4–6], но публикации относительно особенностей структуры и функций везикул, продуцируемых

¹Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*e-mail: kairatr@yandex.ru

соответствующими микроорганизмами в разных условиях среды, в том числе бактериями, адаптированными к антибиотикам, пока отсутствуют.

Ранее нами было показано, что развитие резистентности у пробиотического штамма *Lactiplantibacillus plantarum* 8p-a3 (Биомед, Россия) к антибиотикам (амоксциллину и кларитромицину) *in vitro* сопровождается крупномасштабными геномными перестройками, изменением профиля фенотипической чувствительности к антимикробным препаратам разных групп, а также эволюцией вирулентности — у антибиотикорезистентного штамма *L. plantarum* 8p-a3-Clr-Amx регистрируется высокий уровень токсигенности, в том числе генотоксичности *in vivo* в отношении модельного организма *Drosophila melanogaster* [11].

Выяснение особенностей структуры внеклеточных везикул *L. plantarum* 8p-a3 и *L. plantarum* 8p-a3-Clr-Amx, а также влияния везикул штаммов на модельные бактериальные биопленки явилось задачей данного исследования, в результате выполнения которого впервые показано, что развитие антибиотикорезистентности у пробиотика *L. plantarum* 8p-a3 сопровождается существенными изменениями структуры внеклеточных везикул, в том числе их протеомного профиля, а также характера влияния на биопленки условно-патогенных бактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выделения внеклеточных везикул (ВВ) из культур *L. plantarum* 8p-a3 и 8p-a3-Clr-Amx [1] использовали алгоритм, описанный в работе Kim с соавторами [2]. Для очистки ВВ от клеточного дебриса проводили ультрацентрифугирование

в градиенте плотности Optiprep (45%, 35%, 20%, верхний слой — суспензия везикул); выделенные везикулы обрабатывали ДНКазой и РНКазой и суспендировали в 0.1 М водном растворе NaCl.

Трансмиссионную электронную микроскопию (ТЕМ) изолированных ВВ проводили, как описано [12]. Препараты фиксировали с помощью раствора полилизина и контрастировали в растворе уранилацетата. Образцы анализировали на электронном микроскопе Hitachi HT 7800. Распределение размеров и концентрацию внеклеточных везикул в образцах изолированных везикул определяли с помощью анализа траекторий наночастиц (NTA), используя анализатор NanoSight LM-10 (Malvern Instruments) [13].

ИК-спектры везикул получали с помощью прибора Invenio (Bruker), оснащенный детектором МСТ, и используя приставку НПВО BioATR II с кристаллом ZnSe с наружным покрытием из Si. Спектры получали при спектральном разрешении 4.0 см^{-1} и числе накоплений 128. Соотнесение полос выполняли согласно [14].

Для идентификации белков везикул использовали хромато-масс-спектрометрию, как описано [15]. Трипсинолизированные белки анализировали на ВЭЖХ-МС системе с нанопотоковой системой ВЭЖХ Ultimate 3000 (Thermo, США). Использовали предколону C18 PepMap100 (Thermo, США) и колонку Peaky-75-30 (капиллярная обращено-фазовая колонка Peaky, Мольскта, Россия). Для каждого спектра проводили идентификацию с помощью поисковой машины MSFragger в составе программного пакета FragPipe 19.1. Поиск проводили против аминокислотных последовательностей белков штаммов *L. plantarum* 8p-a3 и 8p-a3-Clr-Amx.

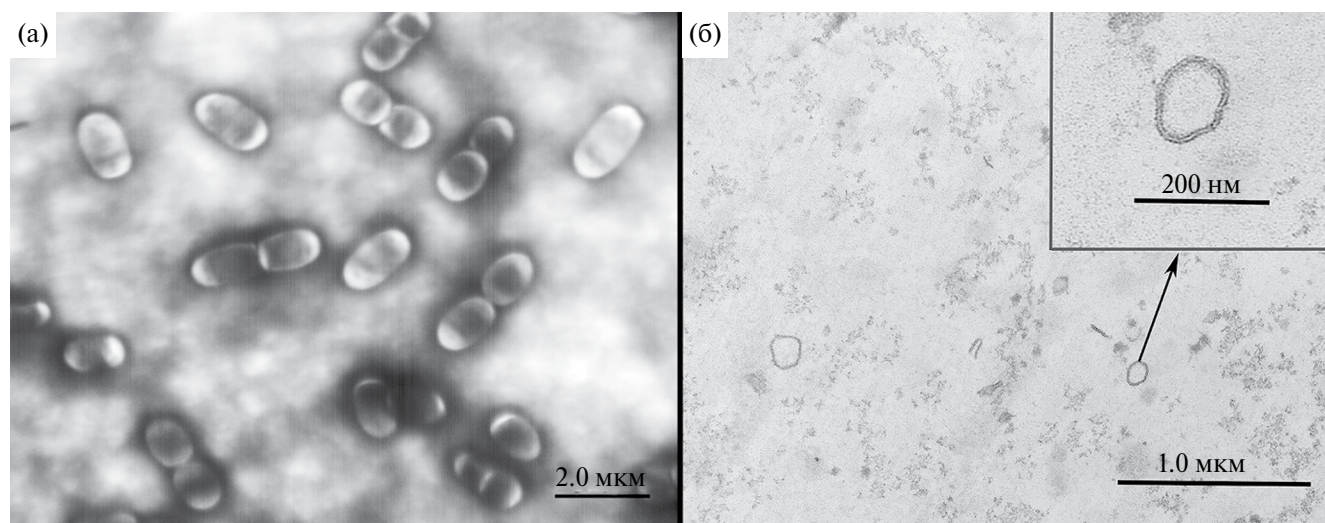


Рис. 1. Микрофотографии изолированных клеток (А) и везикул (Б) пробиотического штамма *L. plantarum* 8p-a3, полученные с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.

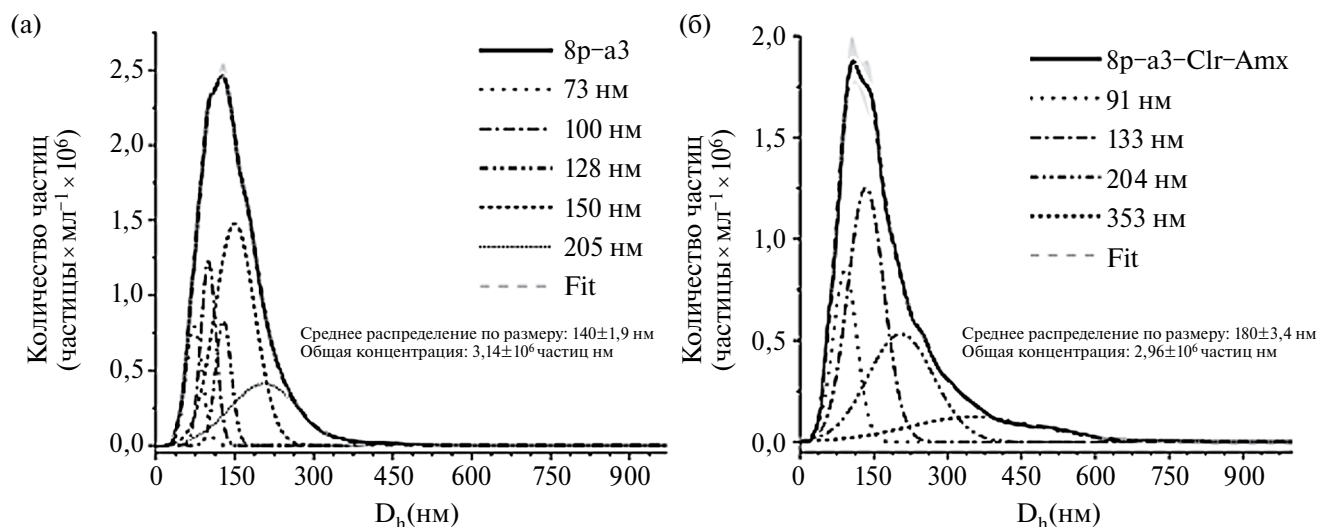


Рис. 2. Распределение размеров и концентрации изолированных везикул штаммов *L. plantarum* 8p-a3 (А) и *L. plantarum* 8p-a3-Clr-Amx (Б), данные получены с помощью анализа траекторий наночастиц.

Для валидации протеомных данных проводили анализ проб методом прицельной масс-спектрометрии с использованием масс-спектрометра Sciex QTRAP 6500+ (Sciex, США) с ВЭЖХ системой ExionLC (Sciex, США). Для разделения пептидов использовали хроматографическую колонку HPLC Column Ultra Aqueous C18 3μm 150x3.0mm (Restek) с защитной предколонкой HPLC Guard Cartridge Ultra Aqueous C18 (Restek). Для каждого спектра проводили идентификацию с помощью поисковой машины MSFragger в составе программного пакета FragPipe 19.1.

Для формирования микробных биопленок и оценки влияния везикул на биомассу биопленок использовали алгоритм, описанный ранее [16]. В лунки планшетов с культурами типовых штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (получены из Американской коллекции культур клеток) и клинического изолята *Serratia marcescens* (любезно предоставлен Институтом медицинской микробиологии университета г. Гиссена, Германия) вносили внеклеточные везикулы штаммов *L. plantarum* (до конечной концентрации 1.25, 5 и 20 мкг/мл по общему белку везикул). Для окрашивания биопленок использовали кристаллический фиолетовый, как описано [16]. Оптическую плотность биопленок определяли при длине волны 600 нм на микропланшетном ридере Tecan infinite 200 Pro (Швейцария).

Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни (программное обеспечение GraphPad Prism версия 6.0. для Windows). Эксперименты проводились в трех биологических и четырех технических повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведения экспериментов были получены данные, свидетельствующие, что развитие антибиотикорезистентности у пробиотического штамма *L. plantarum* 8p-a3 сопровождается изменением физико-химических характеристик везикул. Согласно ТЕМ, везикулы штаммов 8p-a3 и 8p-a3-Clr-Amx имеют типичную для бактериальных везикул морфологию – это сферические наноструктуры, окруженные мембраной (рис. 1).

Согласно NTA (рис. 2), пулы везикул, продуцируемых 8p-a3 и 8p-a3-Clr-Amx, гетерогенны: у штаммов

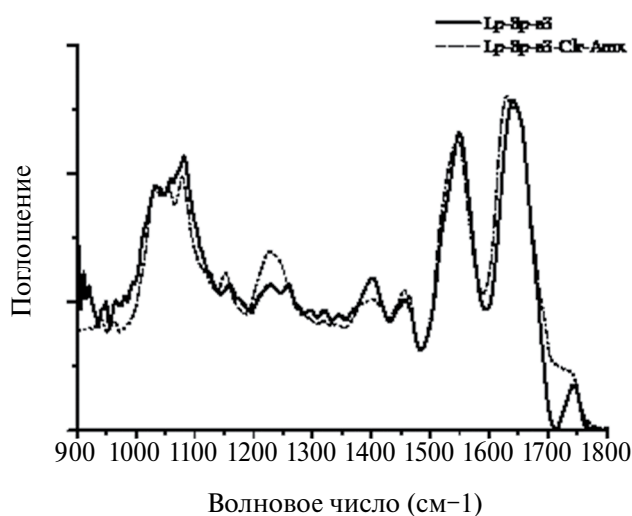


Рис. 3. Инфракрасные спектры везикулярных суспензий *L. plantarum* 8p-a3 (сплошная линия) и *L. plantarum* 8p-a3-Clr-Amx (штриховая линия).

регистрируется несколько везикулярных субпопуляций, различающихся по средним значениям диаметра везикул и представленности; среднее значение диаметра везикул у штаммов 8p-a3 и 8p-a3-Clr-Amx составляет 148±1.9 нм и 180±3.4 нм соответственно. Полученные данные относительно размеров везикул, а также гетерогенности везикулярного пула у штаммов *L. plantarum* не противоречат имеющимся

сведениям о структуре везикул, секретируемых грамположительными (в том числе пробиотическими) бактериями, зависимости показателей от продуцента и условий его роста [5–6], но наличие конкретных везикулярных субпопуляций у пробиотика *L. plantarum* 8p-a3 и изменение их представленности при развитии у штамма антибиотикоустойчивости (рис. 2), впервые продемонстрировано в нашей

Таблица 1. Белки, идентифицированные в везикулах *L. plantarum* 8p-a3 и *L. plantarum* 8p-a3-Clr-Amx, вовлеченные в процессы формирования и ремоделирования клеточной стенки, адгезии и агрегации

№	ID белка	Белок	COG	Длина (aa)	Таксон, в котором обнаруживается белок	Штаммы <i>L. plantarum</i>	
						8p-a3	8p-a3-Clr-Amx
1	WP_024002907.1	DNA/RNA non-specific endonuclease	F	314	<i>L. plantarum</i>		+
2	WP_003641230.1	LCP family protein	K	345	<i>Lactiplantibacillus</i>	+	+
3	WP_003640920.1	LCP family protein	K	397	<i>Lactiplantibacillus</i>		+
4	WP_003640483.1	transglycosylase domain-containing protein	M	767	<i>L. plantarum</i>	+	+
5	WP_046947840.1	LTA synthase family protein	M	701	<i>L. plantarum</i>		+
6	WP_046947851.1	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase family protein	M	444	<i>L. plantarum</i>	+	+
7	WP_072536237.1	NlpC/P60 family protein	M	370	<i>Lactobacillaceae</i>	+	+
8	WP_219041423.1	NlpC/P60 family protein	M	495	<i>L. plantarum</i>	+	+
9	WP_016511814.1	LysM domain-containing protein	M	354	<i>L. plantarum</i>		+
10	WP_134348695.1	C40 family peptidase	M	474	<i>L. plantarum</i>		+
11	WP_003642303.1	transglycosylase	M	131	<i>Lactiplantibacillus</i>		+
12	WP_015825278.1	M15 family metallopeptidase	M	257	<i>L. plantarum</i>		+
13	WP_003642696.1	LTA synthase family protein	M	717	<i>L. plantarum</i>		+
14	WP_013355153.1	LysM domain-containing protein	M	211	<i>L. plantarum</i>		+
15	WP_003641876.1	LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein	M	267	<i>L. plantarum</i>	+	
16	WP_021356008.1	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase family protein	M	412	<i>L. plantarum</i>		+
17	WP_003640496.1	GH25 family lysozyme	M	445	<i>L. plantarum</i>		+
18	WP_046947871.1	GH25 family lysozyme	M	258	<i>L. plantarum</i>		+
19	WP_041153458.1	WxL domain-containing protein	None	1135	<i>L. plantarum</i>	+	+
20	WP_269106197.1	cell surface protein	None	476	<i>L. plantarum</i>	+	+
21	WP_003641660.1	trypsin-like peptidase domain-containing protein	O	420	<i>Lactiplantibacillus</i>		+
22	WP_003643378.1	matrixin family metalloprotease	O	375	<i>L. plantarum</i>		+
23	WP_024002613.1	matrixin family metalloprotease	O	208	<i>L. plantarum</i>		+
24	WP_011101077.1	DNA/RNA non-specific endonuclease	S	387	<i>L. plantarum</i>	+	+
25	WP_003643001.1	WxL domain-containing protein	S	269	<i>L. plantarum</i>	+	+
26	WP_003640312.1	endolytic transglycosylase MltG	S	401	<i>Lactiplantibacillus</i>	+	+
27	WP_003641620.1	WxL domain-containing protein	S	245	<i>Lactiplantibacillus</i>	+	+
28	WP_003643037.1	WxL domain-containing protein	S	190	<i>L. plantarum</i>	+	+
29	WP_011101992.1	WxL domain-containing protein	S	260	<i>L. plantarum</i>	+	+
30	WP_003642319.1	WxL domain-containing protein	S	234	<i>Lactiplantibacillus</i>		+

Обозначения функциональных категорий COG: [F] Транспорт и метаболизм нуклеотидов; [K] Транскрипция; [M] Биогенез клеточной стенки/мембраны/оболочки; [O] Посттрансляционная модификация, обмен белков, шапероны; [S] Функция неизвестна.

работе. Выявленные изменения в популяции везикул лактобациллы могут отражать изменения профиля везикулярного *cargo* (рис. 3, табл.).

Согласно данным инфракрасной спектроскопии, в везикулах обоих штаммов присутствуют липиды, нуклеиновые кислоты, полисахариды и белки (рис. 3). Присутствие таких соединений в составе везикулярного *cargo* было установлено также в случае ряда других бактерий, в том числе пробиотических штаммов *L. plantarum*, и показано, что профиль соединений каждого конкретного класса может существенно изменяться у продуцента в разных условиях роста [3, 6]. В результате нашего исследования впервые установлено изменение везикулярного *cargo* *L. plantarum* при развитии антибиотикоустойчивости у пробиотической бактерии (рис. 3, табл.1).

Согласно данным протеомного анализа, везикулярные пулы белков у штаммов *L. plantarum* 8p-a3 и 8p-a3-Clr-Amx имеют качественные и количественные различия [https://repository.jpostdb.org/entry/JPOST002373]. В везикулах штамма 8p-a3 стабильно регистрируются 39 белков; наиболее представлены белки, участвующие в трансляции, структуре и биогенезе рибосом, биогенезе клеточной стенки и мембраны. В везикулах штамма 8p-a3-Clr-Amx стабильно регистрируются 216 белков; наиболее представленными являются белки, участвующие в транспорте и метаболизме аминокислот, транспорте

и метаболизме углеводов, трансляции, структуре и биогенезе рибосом, а также биогенезе клеточной стенки и мембраны.

Значительную часть везикулярного протеома в случае обоих штаммов составляют белки, вовлеченные в процессы адгезии и агрегации, формирования и ремоделирования клеточной стенки, в том числе гидролитические ферменты (нуклеазы, протеазы, пептидазы, гликозидгидролазы), критичные для взаимодействия с клетками эукариот и прокариот, способные оказывать влияние на бактериальные биопленки [5–6]. Поскольку качественный и количественный состав соответствующих белков в везикулах штаммов существенно различается (табл. 1), функциональный потенциал везикул штаммов, их эффекты в отношении мишени, тоже могут различаться.

В результате наших исследований был обнаружен дифференциальный характер влияния везикул штаммов *L. plantarum* на модельные биопленки условно-патогенных бактерий. Везикулы *L. plantarum* 8p-a3 и *L. plantarum* 8p-a3-Clr-Amx проявляли про- и антибиопленочную активность в отношении *S. aureus* и *P. aeruginosa* (рис. 4) соответственно.

Так, везикулы пробиотического штамма индуцировали увеличение биомассы биопленок, а везикулы антибиотикорезистентного штамма, напротив, ее снижение. При этом в случае

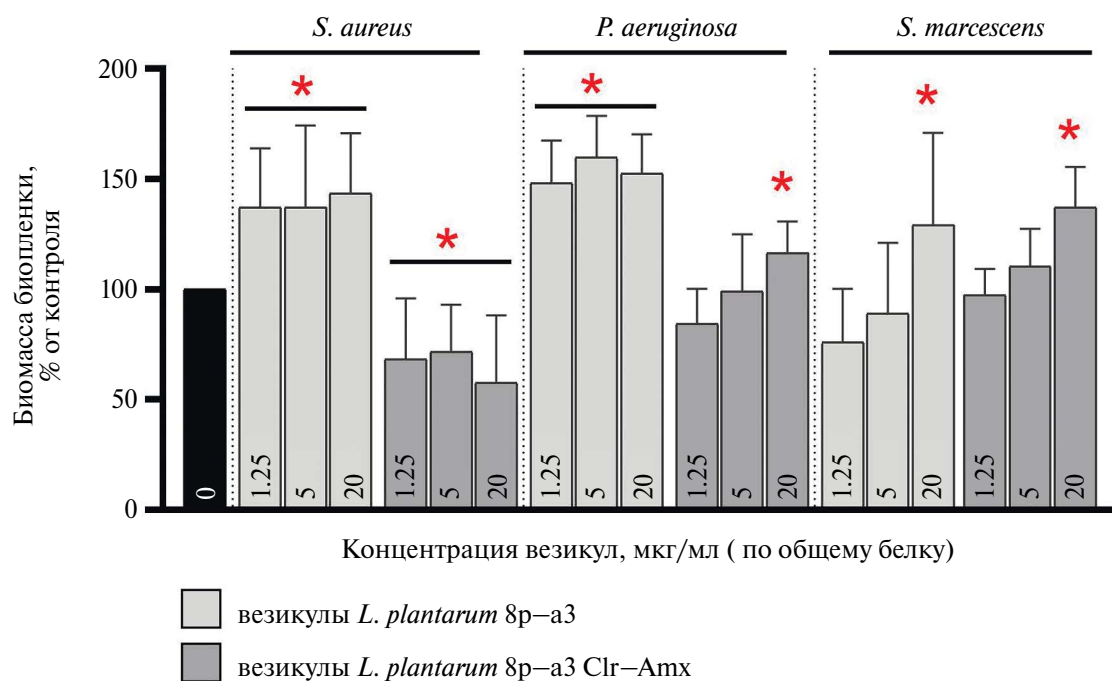


Рис. 4. Биомасса биопленок *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *S. marcescens*, образованных в отсутствие (принято за 100%, черный столбец) и присутствии внеклеточных везикул *L. plantarum* 8p-a3 (светло-серые) и *L. plantarum* 8p-a3-Clr-Amx (темно-серые). На графиках представлены средние значения и указаны стандартные отклонения, * $p < 0.05$.

S. marcescens везикулы обоих штаммов стимулировали биопленкообразование. Способность везикул пробиотических бактерий негативно влиять на бактериальные биопленки описана — с везикулами пробиотиков связывают перспективы получения эффективных антибиопленочных агентов для подавления опасных типов инфекций у человека, ассоциированных с патогенными и условно-патогенными бактериями группы ESKAPE [6]. В этой связи наличие у везикул пробиотика *L. plantarum* 8p-a3 не антибиопленочной, а пробиопленочной активности в отношении модельных биопленок условно-патогенных бактерий указывает на то, что свойства пробиотических бактерий и их наноструктур не исчерпываются описанными ранее — спектр их биологических эффектов много сложнее и для понимания потенциала функций везикул, нацеленных на практические приложения, требуется глобальная инвентаризация везикулярного *cargo*.

Нами была проведена инвентаризация везикулярного *cargo* у штаммов *L. plantarum* 8p-a3 и 8p-a3-Clr-Amx в отношении состава белков (рис. 3), в результате которой было установлено, что в везикулах обоих штаммов присутствуют белки, которые могут как позитивно, так и негативно влиять на плотность биопленки (рис. 3), но у резистентного штамма регистрируется большее разнообразие гидролитических ферментов (пептидазы, лизоцим и др.), потенциально способных приводить к снижению биомассы бактериальных биопленок. Однако необходимо отметить, что часть везикулярного протеома штаммов *L. plantarum* — белки с неизвестной функцией, что препятствует определению полного списка кандидатов в про- или антибиопленочные агенты из пула соответствующих соединений. Помимо белков в эффекты бактериальных везикул в отношении бактериальных биопленок могут быть вовлечены и другие компоненты везикул — значимые различия в ИК-спектрах везикул *L. plantarum* 8p-a3 и 8p-a3-Clr-Amx регистрируются в областях полисахаридов и липидов (рис. 3). Особенности профилей экзогенных липидов и полисахаридов, том числе пробиотических бактерий, могут обуславливать эффекты стимуляции или подавления бактериальных биопленок — это показано в отношении биопленок *Klebsiella pneumonia* [17], а также *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* и *Escherichia coli* [18]. Так ли это в случае везикул *L. plantarum* 8p-a3 и 8p-a3-Clr-Amx, и связано ли это с обнаруженной нами у антибиотикоустойчивого штамма мутацией (loss-of-function) гена *MprF* [11] — мембранного белка, обеспечивающего (посредством синтеза лизилфосфатидилглицерина и модификации липотейхоевых кислот) физико-химические свойства клеточной поверхности, необходимые для выживания и экспансии бактерий в условиях селективного

давления антимикробных препаратов [19, 20], предстоит выяснить.

Таким образом, в результате наших исследований впервые показано, что адаптация пробиотического штамма *L. plantarum* к антимикробным препаратам, ассоциированная с крупномасштабными геномными перестройками, изменениями фенотипического резиста и эволюцией вирулентности, сопровождается также существенными изменениями свойств внеклеточных везикул лактобациллы, связанных с их структурой, составом и активностью в отношении биопленок условно-патогенных бактерий. Полученные данные открывают новые неожиданные свойства внеклеточных везикул пробиотиков и определяют необходимость всесторонней характеристики наноструктур пробиотических бактерий, актуальной для оценки безопасности бактерий, широко используемых в медицине, сельском хозяйстве и биотехнологии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотруднику ИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора И.О. Бутенко за помощь в протеомном анализе и А.А. Музыкантову за помощь в пробоподготовке.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук” и средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM-2023-0013.

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. Gill S., Catchpole R., Forterre P. // FEMS Microbiol. Rev. 2019. V. 43,3. P. 273–303.
2. Kim W., Lee E. J., Bae I. H., et al. // J. Extracell. Vesicles. 2020. V. 9,1. P. 1793514.

3. Charpentier L.A., Dolben E.F., Hendricks M.R., et al. // Membranes. 2023. V. 13,9. P. 752.
4. Dominguez Rubio A.P., D'Antoni C.L., Piuri O.E., et al. // Front. microbiol. 2022. V. 13. P. 864720.
5. Krzyzek P., Marinacci B., Vitale I., et al. // Pharmaceutics. 2023. V. 15,2. P. 522.
6. da Silva Barreira D., Laurent J., Lourenco J., et al. // Sci. Rep. 2023. V. 13,1. P. 1163.
7. Mancino W., Lugli G. A., van Sinderen D., et al. // Microorganisms. 2019. V. 7,12. P. 638.
8. Tardy L., Giraudeau M., Hill G. E., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. V. 116,34. P. 16927–16932.
9. Card K.J., Thomas M.D., Graves Jr.J.L., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. V.118,5. P. e2016886118.
10. Chernova O.A., Chernov V.M., Mouzykantov A.A., et al. // Int. J. Antimicrob. Agents. 2021. V. 57,2. P. 106253.
11. Kostenko V.V., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., et al. // Microbiol. Spectr. 2022. V. 10,3. P. e0236021.
12. Chernov V.M., Chernova O.A., Mouzykantov A.A., et al. // Sci. World J. 2011. V. 11. P. 1120–1130.
13. Burmatova A., Khannanov A., Gerasimov A., et al. // Polymers. 2023. V. 15,15. P. 3248.
14. Zucchiatti P., Mitri E., Kenig S., et al. // Anal. Chem. 2016. V. 88,24. P. 12090–12098.
15. Chernov V.M., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., et al. // J. Proteom. 2014. V. 110. P. 117–128.
16. Baidamshina D.R., Trizna E.Y., Holyavka, M.G., et al. // Sci. Rep. 2017. V.7. P. 46068
17. Hobby C.R., Herndon J.L., Morrow C.A., et al. // Microbiologyopen. 2019. V. 8,2. P. e00635.
18. Bai Y., Luo B., Zhang Y., et al. // Int. J. Biol. Macromol. 2021. V.185. P.1036–1049.
19. Slavetinsky C., Hauser J., Cordula Gekeler C., et al. // eLife . 2022. 11:e66376.
20. Arias-Rojas A, Arifah A, Angelidou G., et al. // PLoS Pathog. 2024. V.20,8. P. e1012462.

THE DEVELOPMENT OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF THE PROBIOTIC STRAIN *LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM* 8P-A3 IS ASSOCIATED WITH CHANGES IN THE STRUCTURE OF EXTRACELLULAR VESICLES AND THE CHARACTER OF THEIR EFFECT ON BACTERIAL BIOFILMS

O. A. Chernova^a, A. R. Kayumov^{b, *}, M.I. Markelova^{a, b}, V. V. Salnikov^a, M. P. Kutyreva^b,
A. A. Khannanov^b, M. S. Fedorova^b, D. E. Zhuravleva^b, N. B. Baranova^{a, b}, D. A. Faizullin^a,
Yu. F. Zuev^a, V. M. Chernov^a

^aKazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Kazan Science Centre of the Russian Academy of Science,
Kazan, Russian Federation

^bKazan Federal University, Kazan, Russian Federation

*e-mail: kairatr@yandex.ru

Presented by Academician of the RAS AN Grechkin

For the first time, it was shown that the development of resistance to antibiotics (amoxicillin and clarithromycin) *in vitro* in the probiotic strain *Lactiplantibacillus plantarum* 8p-a3, associated with large-scale genomic rearrangements, a change in the profile of phenotypic sensitivity to antimicrobials of different groups, and the evolution of virulence, is also accompanied by significant changes in the lactobacillus-derived extracellular membrane vesicles transferring lipids, polysaccharides, proteins, and nucleic acids. The changes are related to the structure and *cargo* of vesicles, as well as their activity against biofilms of opportunistic bacteria. The data obtained are relevant for understanding the molecular mechanisms of survival of microorganisms under the selective pressure of antimicrobials, the functional potential of the probiotic vesicles and assessing their safety.

Keywords: probiotic bacteria, antibiotic resistance, extracellular vesicles, structure and function, proteome, bacterial biofilms

УДК 57.084.1; 616.89; 577.25

РОЛЬ BDNF В ПРОТИВОДЕПРЕССИВНЫХ ЭФФЕКТАХ ЭЛЕКТРОСУДОРОЖНОЙ ТЕРАПИИ

© 2024 г. В. М. Ушакова^{1, 2, *}, Е. А. Зубков¹, А. Ю. Морозова¹, К. А. Павлов¹,
Я. А. Зоркина¹, О. В. Абрамова¹, А. Г. Очнева¹, Член-корреспондент РАН О. И. Гурина¹,
К. Ш. Тарковская¹, А. Н. Иноземцев², Академик РАН В. П. Чехонин^{1, 3}

Поступило 15.07.2024 г.

После доработки 15.08.2024 г.

Принято к публикации 17.08.2024 г.

Электросудорожная терапия (ЭСТ) считается эффективным методом лечения депрессии, который оказывает ряд биологических эффектов, в том числе воздействуя на нейротрофические факторы. В данной работе было проведено исследование влияния ЭСТ на поведение крыс при депрессивно-подобном состоянии, вызванном применением ультразвука переменной частоты (20–45 кГц) и изучен вклад изменения экспрессии нейротрофического фактора мозга (BDNF) в наблюдаемые эффекты. Результаты исследования подтверждают терапевтический потенциал ЭСТ в нивелировании депрессивно-подобного состояния у грызунов и роль BDNF в данных процессах. В дальнейшем необходимо исследовать связь нейротрофина со структурными изменениями и изучить другие нейротрофические биомаркеры, которые могут быть связаны с развитием депрессивно-подобного состояния и действием терапии.

Ключевые слова: электросудорожная терапия, депрессия, ультразвук, BDNF, крысы

DOI: 10.31857/S2686738924060069

ВВЕДЕНИЕ

Ввиду широкой распространенности психических заболеваний проблема поиска новых и усовершенствования существующих методов терапии является важной задачей современной медицины. Одним из наиболее распространенных психических расстройств является депрессия. Риск развития депрессии в течение жизни составляет

примерно 15–18%, при этом примерно каждый пятый в мире сталкивается в течение жизни хотя бы с одним депрессивным эпизодом [1].

Электросудорожная терапия (ЭСТ) представляет собой эффективный метод лечения ряда психических заболеваний, в том числе тяжелой и лекарственно-устойчивой депрессии [2, 3]. Так, показано, что примерно треть пациентов оказываются устойчивыми к нескольким противодепрессивным препаратам первой линии, и для них наиболее действенным методом лечения считается ЭСТ [4, 5]. Терапия оказывает ряд биологических эффектов, влияя на нейромедиаторные системы мозга, воспалительные и эндокринные факторы, а также нейротрофические системы [6]. Тем не менее для оценки ответа на терапию и снижения побочных эффектов требуется детальное изучение механизмов воздействия и исследование биологических маркеров, связанных с применением ЭСТ. Ранее нами были показаны эффекты воздействия ЭСТ на когнитивные функции лабораторных животных [7].

Целью данной работы стало исследование противодепрессивных эффектов терапии в модели депрессивно-подобного состояния, вызванного

¹Отдел фундаментальной и прикладной нейробиологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства Здравоохранения России, Москва, Россия

²Кафедра высшей нервной деятельности, биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

*e-mail: ushakovavm@yandex.ru

воздействием ультразвуковых (УЗ) волн переменной частоты, а также определение вклада изменения экспрессии нейротрофического фактора мозга (BDNF) в наблюдаемые эффекты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа была проведена на самцах крыс линии Wistar весом 200–250 г. ($n=28$). Животные были разделены на 4 группы: контроль ($n=7$), группа с депрессивно-подобным состоянием, вызванным УЗ (группа УЗ, $n=7$), группа с экспериментальной депрессией, подвергавшаяся воздействию ЭСТ (группа УЗ+ЭСТ, $n=7$) и контрольная группа, подвергавшаяся воздействию ЭСТ (группа К+ЭСТ, $n=7$). Животные содержались при температуре 20–22°C, не инвертированном 12-часовом световом дне, доступе к пище и воде *ad libitum*.

Депрессивно-подобное состояние формировалось путем непрерывного воздействия УЗ волн (20–45 кГц) на протяжении 21 дня при помощи УЗ генератора “Weitech” (Wavre, Belgium). ЭСТ проводилась регулярно в течение 10 дней после формирования депрессивно-подобного состояния при помощи аппарата “ЭСТЕР” (ТРИМА, Россия). Для терапии использовались следующие параметры стимуляции: сила тока 70 мА, частота импульсации 50 Гц, длительность стимулов 500 мсек. После воздействия животное впадало в последовательный тонико-клонический судорожный припадок, длящийся примерно 30 сек.

Поведенческие тесты проводились в интервале с 10 до 14 часов. Поведение животных регистрировалось при помощи видеокамеры и анализировалось при помощи программы RealTimer (Open Science, Россия).

Уровень ангедонии грызунов оценивали в тесте “Предпочтение раствора сахарозы”. Лабораторным крысам предъявляли 2 поилки в условиях свободного выбора: с раствором сахарозы (1%) и раствором питьевой воды. Поилки меняли местами для исключения предпочтения места. Спустя 24 часа оценивался объем выпитой жидкости, индекс предпочтения сахарозы рассчитывался по формуле: $V_c / (V_c + V_v) * 100\%$, где V_c — объем выпитого раствора сахарозы, V_v — объем выпитой воды.

В тесте принудительного плавания по Порсолту каждое животное помещалось в емкость, заполненную водой до отметки на высоте 30 см на 8 минут (t воды 24°C). Высота сосуда составляла 40 см, диаметр — 31 см. В течение последних 6 минут эксперимента регистрировали продолжительность активного и пассивного плавания, а также длительность неподвижности (иммобильности).

Количественное определение мРНК гена *BDNF* проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Экспрессия

определялась в гиппокампе и стриатуме экспериментальных животных. Для получения образцов мозга грызуны подвергались наркотизации парами диэтилового эфира с последующей декапитацией. Полученные образцы хранили при температуре –70°C. ПЦР в реальном времени проводилась согласно протоколу, описанному ранее [8]. В качестве гена сравнения был использован ген *GAPDH*. Относительная экспрессия исследуемого гена определялась по формуле $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm 2^{\pm SEM\Delta Ct}$.

Для статистического анализа данных была использована программа *jamovi* (версия 2.3.21). Нормальность распределения определялась при помощи критерия Шапиро–Уилка. В случае нормального распределения данные были проанализированы при помощи ANOVA критерия с последующим множественным сравнением по Тьюки и представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Для оценки корреляций был использован корреляционный анализ с определением коэффициента Спирмана. Данные считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки наличия депрессивно-подобных симптомов у группы, подвергавшейся воздействию УЗ, и определения эффективности ЭСТ были проведены тесты, направленные на оценку депрессивно-подобной компоненты поведения. При анализе результатов поведения критерий Шапиро–Уилка показал нормальность распределения исследуемых выборок ($p > 0.05$). В тесте “Предпочтение раствора сахарозы” статистически значимых межгрупповых различий в показателе индекса предпочтения сахарозы, отражающего состояние ангедонии у животных, получено не было ($F=1.52$, $p=0.256$) (Рис. 1).

В тесте “Принудительное плавание по Порсолту” были выявлены статистически значимые различия ($F=3.47$, $p < 0.05$) (рис. 2). У группы с моделированным депрессивно-подобным состоянием наблюдалось значимое увеличение длительности иммобильности ($p < 0.05$), что может отражать депрессивно-подобное поведение. Применение ЭСТ восстановило увеличенные показатели иммобильности до контрольного уровня ($p < 0.01$), что свидетельствует об антидепрессанто-подобном эффекте терапии. Использование стимуляции у контрольных животных не привело к выраженному изменению поведения.

При оценке результатов молекулярно-генетического анализа критерий Шапиро–Уилка также показал нормальность распределения ($p > 0.05$). Статистически значимых различий в уровне экспрессии мРНК *BDNF* в стриатуме получено не было ($F=3.13$, $p=0.081$) (табл. 1). В то же время в гиппокампе

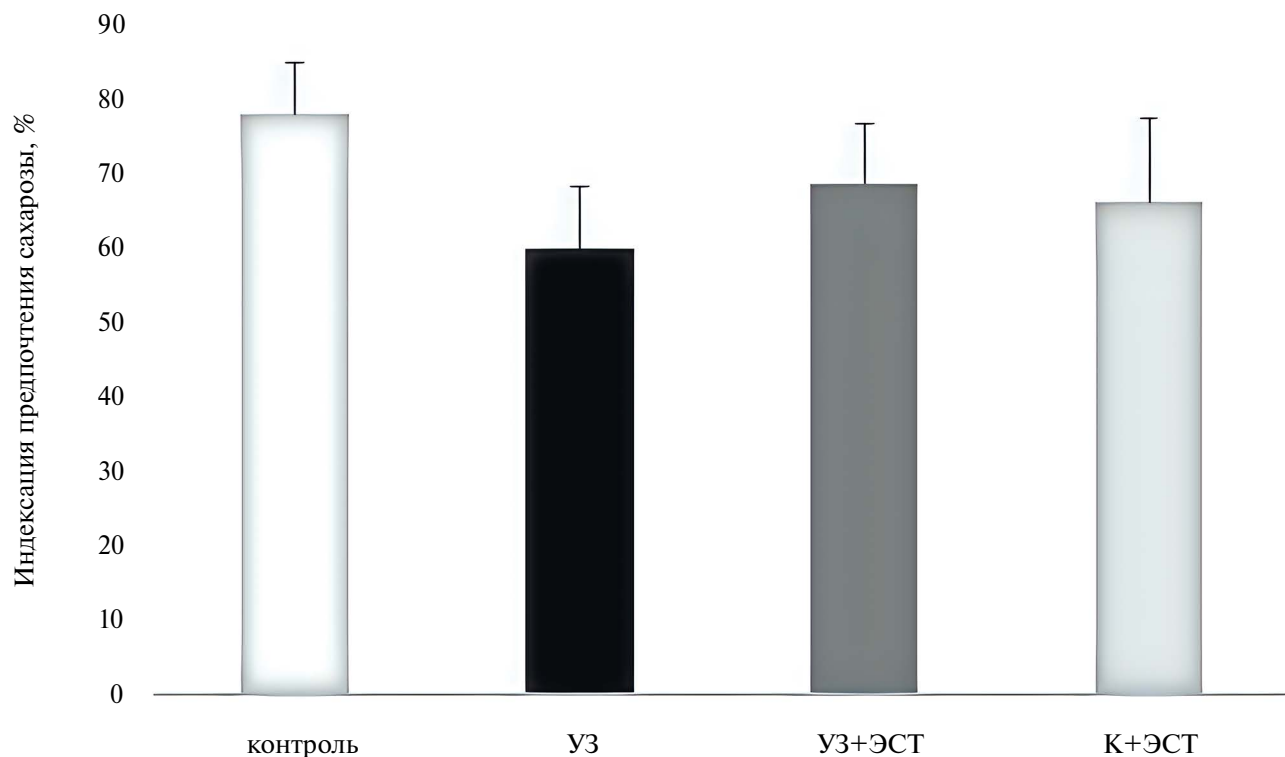


Рис. 1. Оценка поведенческих эффектов ЭСТ в тесте “Предпочтение раствора сахарозы”. Различия индекса предпочтения раствора сахарозы (%) в тесте.

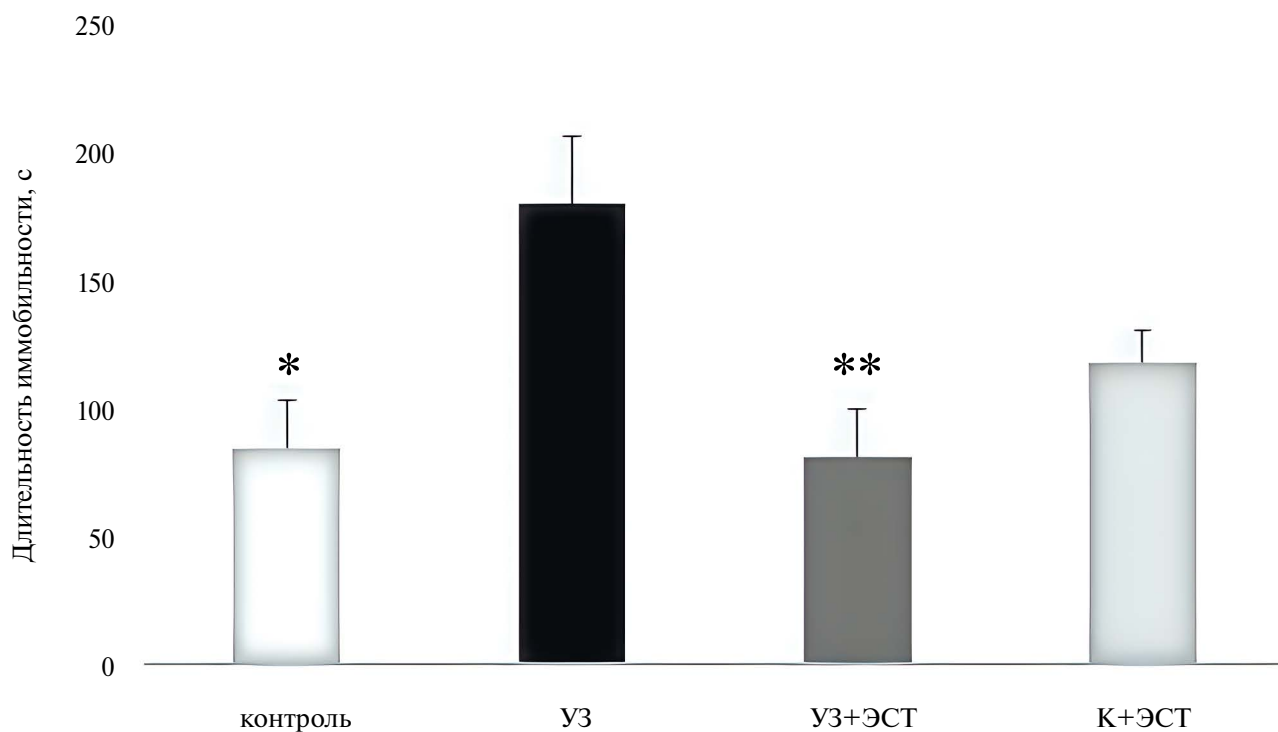


Рис. 2. Оценка поведенческих эффектов ЭСТ в тесте “Принудительное плавание по Порсолту”. Различия длительности иммобильности (с) в тесте. * – отличия от УЗ группы; * – $p<0.05$, ** – $p<0.01$.

Таблица 1. Изменение экспрессии гена *BDNF* в стриатуме и гиппокампе крыс при воздействии УЗ и ЭСТ

Группы	Экспрессия мРНК <i>BDNF</i> в стриатуме	Экспрессия мРНК <i>BDNF</i> в гиппокампе
Контроль	1.247 (0.51–2.6)	1.157 (0.37–2.43)
УЗ	0.586 (0.46–1.98)	0.371 (0.25–1.38)
УЗ+ЭСТ	2.685 (1.99–4.14)	1.861** (1.27–3.56)
К+ЭСТ	2.001 (1.29–3.41)	1.361 (0.43–2.44)

** – $p < 0.01$.

наблюдались выраженные межгрупповые отличия ($F=29.75$, $p < 0.001$). Несмотря на то, что значимой разницы между экспрессией *BDNF* в группе УЗ и контроля обнаружено не было, средние значения экспрессии в контрольной группе превышали подобные показатели в группе с депрессивно-подобным состоянием более чем в 2 раза (табл. 1).

Применение ЭСТ вызвало значимый рост экспрессии *BDNF* в гиппокампе крыс, подвергавшихся воздействию УЗ ($p < 0.01$). Изменения экспрессии в гиппокампе коррелировали с таковыми в стриатуме ($\rho=0.721$). Также наблюдалась слабо выраженная корреляция уровня мРНК *BDNF* в гиппокампе и с поведением: данные положительно коррелировали с индексом предпочтения раствора сахарозы ($\rho=0.569$) и отрицательно с длительностью иммобильности ($\rho = -0.433$). Эти результаты могут указывать на вклад изменения экспрессии гена в наблюдаемые поведенческие эффекты и на роль *BDNF* в терапевтическом действии ЭСТ.

Многие исследователи связывают положительные эффекты ЭСТ с влиянием на синаптическую пластичность в головном мозге и нейрогенез [9, 10]. Ввиду ключевой роли *BDNF* в данных процессах [11], активирующее влияние стимуляции на нейротрофин может опосредовать и структурные изменения. Снижение уровня *BDNF* и атрофия лимбических структур мозга сопровождается депрессивными расстройствами [12], а воздействие ЭСТ на людей и животных активирует нейротрофические системы [3]. Кроме того, повышение уровня *BDNF* наблюдается и при терапии антидепрессантами, например, селективными ингибиторами обратного захвата серотонина [13]. Это косвенно может подтверждать связь изменения экспрессии *BDNF* именно с противодепрессивными эффектами терапии.

Таким образом, наблюдаемые нами поведенческие эффекты ЭСТ могут быть опосредованы активацией структурных изменений головного мозга за счет увеличения уровня *BDNF*. В дальнейшем необходимо изучить влияние УЗ и ЭСТ на пластические процессы головного мозга крыс, а также исследовать роль других нейротрофических биомаркеров в эффектах стимуляции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе были показаны противодепрессивные эффекты ЭСТ в модели воздействия УЗ волн переменной частоты. Подобное положительное влияние терапии может быть связано с активацией *BDNF* в головном мозге. Полученные данные вносят вклад в понимание механизмов действия терапии и подтверждают роль *BDNF* в оказываемых лечебных эффектах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета института учреждения. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Условия содержания и проведение всех экспериментальных процедур осуществлялись в соответствии с Директивой 2010/63/EU от 22 сентября 2010 года. Протоколы с использованием животных были одобрены локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России (протокол №1 от 19.10.2023).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Malhi G.S., Mann J.J. Depression // Lancet. 2018. Vol. 392. P. 2299–2312.
2. Kellner C.H., Kaicher D.C., Banerjee H., et al. Depression severity in electroconvulsive therapy (ECT)

- versus pharmacotherapy trials // *The journal of ECT*. 2015 Vol. 31. P. 31–33.
3. *Kritzer M.D., Peterchev A.V., Camprodon J.A.* Electroconvulsive Therapy: Mechanisms of Action, Clinical Considerations, and Future Directions // *Harvard review of psychiatry*. 2023. Vol. 31, N 3. P. 101–113.
 4. *Réus G.Z., de Moura A.B., Borba L.A., et al.* Strategies for Treatment-Resistant Depression: Lessons Learned from Animal Models // *Molecular neuropsychiatry*. 2019. Vol. 5, N 4. P. 178–189.
 5. *Subramanian S., Lopez R., Zorumski C.F., et al.* Electroconvulsive therapy in treatment resistant depression // *Journal of the neurological sciences*. 2022. Vol. 434:120095.
 6. *Maffioletti E., Carvalho Silva R., Bortolomasi M., et al.* Molecular Biomarkers of Electroconvulsive Therapy Effects and Clinical Response: Understanding the Present to Shape the Future // *Brain sciences*. 2021. Vol. 11, N 9: 1120.
 7. *Ушакова В.М., Zubkov E.A., Морозова А.Ю., и др.* Влияние электросудорожной терапии на когнитивные функции крыс при депрессивно-подобном состоянии // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017. Т. 163. № 5. С. 549–552.
 8. *Морозова А.Ю., Zubkov E.A., Кошкин Ф.А., и др.* Экспрессия генов, кодирующих серотониновые рецепторы и SERT в различных структурах мозга у стрессированных хроническим воздействием ультразвука крыс // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013. Т. 156. № 9. С. 291–294.
 9. *Chen F., Danladi J., Wegener G., et al.* Sustained Ultrastructural Changes in Rat Hippocampal Formation After Repeated Electroconvulsive Seizures // *The international journal of neuropsychopharmacology*. 2020. Vol. 23, N7. P. 446–458.
 10. *Giacobbe J., Pariante C.M., Borsini A.* The innate immune system and neurogenesis as modulating mechanisms of electroconvulsive therapy in pre-clinical studies // *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*. 2020. Vol. 34, N10. P. 1086–1097.
 11. *Kowiański P., Lietzau G., Czuba E., et al.* BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity // *Cellular and molecular neurobiology*. 2018. Vol. 38, N3. P. 579–593.
 12. *Duman R.S., Deyama S., Fogaça M.V.* Role of BDNF in the pathophysiology and treatment of depression: Activity-dependent effects distinguish rapid-acting antidepressants // *The European journal of neuroscience*. 2021. Vol. 53, N1. P. 26–139.
 13. *Björkholm C., Monteggia L.M.* BDNF — a key transducer of antidepressant effects // *Neuropharmacology*. 2016. Vol. 102. P. 72–79.

THE ROLE OF BDNF IN THE ANTIDEPRESSANT EFFECTS OF ELECTROCONVULSIVE THERAPY

**V. M. Ushakova^{a, b}, E. A. Zubkov^a, A. Yu. Morozova^a, K. A. Pavlov^a,
Ya. A. Zorkina^a, O. V. Abramova^a, A. G. Ochneva^a,
Corresponding Member of RAS O. I. Gurina^a, K. Sh. Tarkovskaya^a,
A. N. Inozemtsev^b, Academician of the RAS V.P. Chekhonin^{a, c}**

^a*Department of Basic and Applied Neurobiology, V. Serbsky National Medical Research Centre of Psychiatry and Narcology under the RF Ministry of Public Health, Moscow, Russian Federation*

^b*Department of Higher Nervous Function, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

^c*Department of Medical Nanobiotechnologies, The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation*

*e-mail: ushakovvm@yandex.ru

Electroconvulsive therapy (ECT) is an effective treatment method for depression therapy. It produces a number of biological effects, including neurotrophic factors regulation. In the present paper, we investigated the ECT response in depressed rats subjected to the variable frequency ultrasound (20–45 kHz) and examined the contribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression changes to the observed effects. The obtained results reflect the therapeutic potential of ECT for the treatment of depressive-like state in rodents and indicate the role of BDNF in these processes. In the future research, it is necessary to investigate the relationship between neurotrophin and structural changes and to study other neurotrophic biomarkers that may be associated with the development of depression-like state and the therapy response.

Keywords: electroconvulsive therapy, depression, ultrasound, BDNF, rats

УДК 577:[57.017:597.552.511]

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА У СМОЛТОВ ГОРБУШИ *ONCORHYNCHUS GORBUSCHA* (WALB.) ПРИ СМЕНЕ СОЛЕННОСТИ СРЕДЫ

© 2024 г. Н. С. Шульгина, М. В. Кузнецова*, М. А. Родин, М. Ю. Крупнова, Д. А. Ефремов, С. А. Мурзина, академик РАН Н. Н. Немова

Поступило 03.08.2024 г.

После доработки 17.08.2024 г.

Принято к публикации 18.08.2024 г.

Исследовали активность ключевых ферментов энергетического и углеводного обмена (цитохром с оксидазы (ЦО), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), альдолазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) и 1-глицерофосфатдегидрогеназы (1-ГФДГ)) у смолтов горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walb.) Белого моря в садковом эксперименте, моделирующем ее переход из пресной среды в морскую. Выявлено снижение активности ЦО, Г6ФДГ, 1-ГФДГ и усиление – ЛДГ и альдолазы у молоди при повышении солёности воды. Полученные результаты позволяют предположить, что у горбуши происходит перераспределение энергетических субстратов между реакциями аэробного и анаэробного обмена в сторону усиления анаэробного синтеза АТФ. Это может свидетельствовать о реализации у молоди горбуши адаптивных механизмов перестройки метаболизма, направленной на энергообеспечение процесса осморегуляции при изменении солёностного режима среды обитания.

Ключевые слова: горбуша, ферменты, энергетический обмен, солёность, смолтификация, Белое море
DOI: 10.31857/S2686738924060071

ВВЕДЕНИЕ

Солёность является одним из важнейших абиотических факторов среды, оказывающих влияние на жизнедеятельность водных организмов, в том числе рыб. Виды рыб отличаются по степени приспособленности к колебаниям солёности среды обитания. Неспособность регулировать водно-солевой обмен может привести к обезвоживанию, что считается основной причиной смертности организмов при акклиматизации к морской воде [1]. Процесс адаптации эвригалинных рыб к изменению солёности среды связан с преобразованиями в осморегуляторной системе и перераспределением энергетических ресурсов организма [2]. В исследованиях интенсивности потребления кислорода в условиях изменения солёности воды, показано, что модуляция и стимуляция процессов транспорта ионов у рыб сопровождается значительным увеличением

расхода энергии [2, 3]. Удовлетворение возросших потребностей организма рыб в энергии при их акклиматизации к смене солёностного режима обеспечивается метаболическими перестройками, связанными с изменением в направлении и интенсивности путей энергетического и углеводного обмена. Установлено, что энергия, необходимая осморегуляторным органам рыб (жабрам и почкам) для поддержания ионного гомеостаза образуется, прежде всего, за счёт окисления глюкозы и лактата, поступающих из кровеносных сосудов [3]. Определение изменения в количестве энергетических субстратов или активности ферментов, участвующих в их превращении, может дать представление об уровне энергозатрат, связанных с регуляцией метаболизма при изменении солёности среды [2]. Различия в характере изменения активности ферментов энергетического и углеводного обмена в условиях адаптации к разной солёности были ранее показаны в исследованиях на эвригалинных и анадромных видах рыб [2, 4–7]. В отличие от большинства видов лососевых, горбуша смолтифицируется вскоре после вылупления, что позволяет ей мигрировать в океан в раннем возрасте [8]. Поскольку эта особенность требует сравнительно быстрой ответной реакции организма

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

*E-mail: kuznetsovamvi@yandex.ru

на смену солености среды обитания, можно предположить, что энергетически процесс гипоосморегуляции обеспечивается изменением направления и интенсивности путей энергетического обмена и окисления глюкозы.

Целью данной работы было оценить активность ферментов энергетического и углеводного обмена (цитохром с оксидазы, лактатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 1-глицерофосфатдегидрогеназы и альдолазы) у смолтов горбуши в период ската, в экспериментальных условиях, модулирующих ее переход на разные по солености участки миграционного пути (река, эстуарий, море).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали смолтов горбуши, отловленных в естественных условиях в период ската в реке Индера бассейна Белого моря и помещенных в садки с разными условиями солености для экспозиции. Использовали три одинаковых садка, установленных в разных местах миграционного пути горбуши — непосредственно в реке Индера (пресная вода), в эстуарии реки (распресненная вода, соленость в прилив — 6‰, в отлив — 0‰) и в Белом море (соленость 30‰). В начале эксперимента (28 мая) отловили около 1000 смолтов горбуши из реки и поместили в речной садок. Спустя сутки (29 мая) особей в количестве 15 штук взяли на анализ (усыпляли с помощью гвоздичного масла и фиксировали в жидком азоте) в качестве контроля, а оставшихся распределили по трем группам — садкам “река”, “эстуарий”, “море”. Через 24 часа (30 мая) и 72 часа (1 июня) экспозиции в каждом садке производили отбор и фиксацию молоди (по 15 особей на группу) для дальнейшего биохимического анализа. Размерно-весовые характеристики исследуемых рыб, а также даты взятия проб и температура воды, представлены в табл. 1.

Активность исследуемых ферментов определяли (индивидуально для каждой особи) спектрофотометрически по общепринятым методикам [9–11] и выражали в мкмоль/(мин)*мг белка. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорд [12].

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью критерия Краскела—Уоллиса с последующим сравнением выборок с использованием критерия Манна—Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Биохимический анализ выполнен на базе лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН с использованием оборудования Центра коллективного пользования ФИЦ “КарНЦ РАН”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получены результаты, указывающие на различия в изменениях активности исследуемых ферментов энергетического и углеводного обмена у горбуши при переносе из пресной воды в соленую. Активность ЦО у молоди в морском садке через трое суток экспозиции была достоверно ниже, чем таковая у рыб в эстуарном садке (рис. 1 а, $p < 0.05$). Это указывает на снижение уровня аэробного обмена после перемещения мальков в среду с большей соленостью. При этом активность ЛДГ была выше у рыб в морском садке по сравнению с речным уже через сутки после переноса и через трое суток эти различия сохранялись и были выявлены также для активности альдолазы (рис. 1 б, $p < 0.05$), что указывает на более высокую интенсивность процессов анаэробного обмена и использования углеводов в гликолизе в гиперосмотических условиях.

Более низкая аэробная емкость у молоди горбуши в море, вероятно, компенсируется анаэробным синтезом АТФ. Подобная компенсаторная реакция была выявлена у смолтов горбуши в нашем предыдущем исследовании, где рыб выдерживали в море в течение 10 суток в длительном садковом эксперименте [7]. Ранее было показано, что личинки горбуши лучше других видов тихоокеанских лососей способны приспосабливаться к изменению солености среды обитания, регулируя концентрацию ионов в плазме крови при резком переходе в морскую воду [13].

Согласно данным литературы [3], анаэробный метаболизм углеводов играет ведущую роль

Таблица 1. Размерно-весовые характеристики молоди горбуши из разных групп в садковом эксперименте

Группа	Т, °С воды (в день отбора)	Длина (TL), см*	Масса, г*
29.05 до эксперимента (контроль-нулевая точка), река	6.8	3.23±0.05	0.15±0.01
30.05 садок “река” (24 часа экспозиции)	6.4	2.83±0.05	0.13±0.00
30.05 садок “эстуарий” (24 часа экспозиции)	10.1	2.90±0.06	0.13±0.00
30.05 садок “море” (24 часа экспозиции)	6.4	2.99±0.05	0.14±0.01
01.06 садок “река” (72 часа экспозиции)	8.8	2.97±0.04	0.15±0.00
01.06 садок “эстуарий” (72 часа экспозиции)	7.3	2.85±0.03	0.15±0.01
01.06 садок “море” (72 часа экспозиции)	7.3	2.87±0.04	0.15±0.01

Примечание: TL — абсолютная длина тела, *среднее значение и его ошибка.

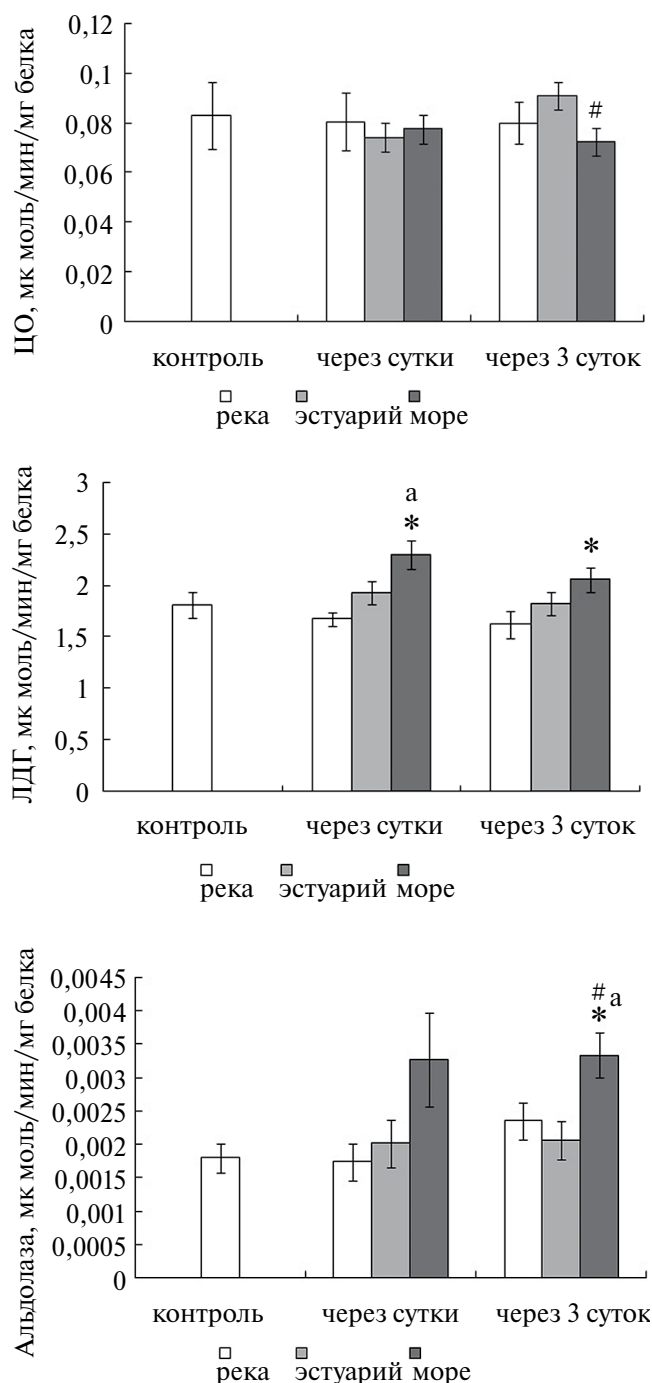


Рис. 1. Относительная активность ферментов ЦО (а), ЛДГ (б), альдолазы (в) (мкмоль/мин/мг белка) у смолтов горбуши при переносе в садки с разной солесностью. Различия достоверны при $p < 0.05$: * — по сравнению с группой рыб в речном садке, # — по сравнению с группой рыб в эстуарном садке, а — по сравнению с контрольной группой.

в адаптивных реакциях водно-солевого обмена к обитанию рыб в морской воде, являясь механизмом, быстро реагирующим на изменение

потребностей в энергии АТФ. О значении анаэробного гликолиза у рыб в энергообеспечении процесса осморегуляции свидетельствует увеличение интенсивности окисления глюкозы и лактата, которые, как было показано [2], становятся основными источниками энергии при адаптации разных видов рыб к изменению солесности среды обитания.

У смолтов горбуши в садке с морской водой установлены относительно более низкие значения активности Г6ФДГ (спустя сутки экспозиции по сравнению с речным садком, а также спустя трое суток по сравнению с эстуарным) и 1-ГФДГ (спустя трое суток по сравнению с речным садком) (рис. 2 а, б, $p < 0.05$). Это свидетельствует о более низком уровне использования продуктов распада углеводов в липидном обмене, что может быть связано со снижением образования восстановителей в виде НАДФН в пентозо-фосфатном пути, а также 1-глицерофосфата, необходимых для реакций биосинтеза липидов [14,15]. Принимая во внимание наблюдаемое у рыб в морском садке снижение активности ЦО и увеличение — ЛДГ и альдолазы, можно предположить, что у исследуемой молодежи горбуши происходит перераспределение углеводов между реакциями энергетического обмена, пентозо-фосфатного пути, в сторону анаэробного синтеза АТФ. Вышеуказанные вариации активности исследуемых ферментов при резком увеличении концентрации ионов в организме рыб, содержащихся в морской воде, по-видимому, связаны с перестройкой метаболизма и согласуются с “запуском” механизмов перераспределения энергии между осморегуляцией и другими энергозатратными метаболическими процессами, такими как рост и развитие [5,16]. Установленные относительно более низкие значения активности Г6ФДГ и 1-ГФДГ у горбуши в морском садке по сравнению с речным аналогичны полученным нами в длительном садковом эксперименте по изучению адаптивных возможностей смолтов горбуши на разных по солесности участках их покатной миграции (реки, эстуария, моря) [7]. Это может указывать как на устойчивое формирование, так и на последующее сохранение (как минимум до 10 суток) адаптивных перестроек путей энергетического и углеводного обмена у смолтов горбуши при их переносе из пресной воды в соленую.

У особей горбуши, помещенных в эстуарный садок, не было установлено различий по исследуемым показателям с группой из реки (рис. 1 и 2). Такие различия в активности ЦО, ЛДГ, 1-ГФДГ и альдолазы были характерны для смолтов только спустя 10 суток их экспозиции в эстуарии в более длительном эксперименте, проведенном нами ранее [7]. Вероятно, у рыб, находящихся под влиянием суточных колебаний солесного и температурного режимов воды эстуария, адаптивные модуляции энергетического обмена проявляются спустя более продолжительный период воздействия этих условий.

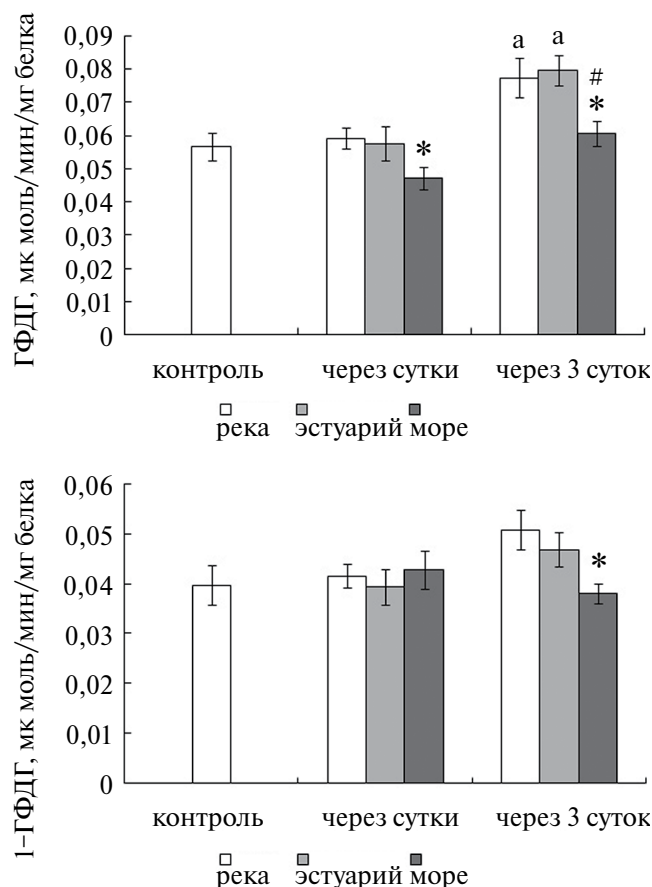


Рис. 2. Относительная активность ферментов Г6ФДГ (а), 1-Г6ФДГ (б) (мкмоль/мин/мг белка) у смолтов горбуши при переносе в садки с разной соленостью. Обозначения как на рис. 1.

Таким образом, результаты проведенного исследования изменений активности ферментов энергетического и углеводного обмена у мигрирующих смолтов горбуши при смене солености среды обитания свидетельствуют о наличии у них адаптивных метаболических перестроек в аэробном и анаэробном обмене, функционировании пентозо-фосфатного пути. По-видимому, в организме рыб после миграции в море происходит усиление анаэробного пути синтеза АТФ за счет повышения уровня утилизации углеводов путем гликолиза, и, напротив, снижение степени использования углеводов в пентозо-фосфатном пути и продуктов их распада в липидном обмене, что является одним из механизмов биохимической адаптации молоди горбуши к переходу из пресной воды в соленую.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование финансировалось за счет средств государственного бюджета, выделенных по государ-

ственному заданию КарНЦ РАН FMEN2022-0006 и FMEN2022-0007.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с международными, национальными и институциональными рекомендациями по использованию животных. Эксперименты были одобрены Комиссией по биоэтике Института биологии Карельского научного центра РАН (протокол заседания № 8 от 25 июля 2024 года).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takei Y., Hiroi J., Takahashi H., et al. Diverse mechanisms for body fluid regulation in teleost fishes // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2014. V. 307. № 7. P. 778–792.
2. Soengas J.L., Sangiao-Alvarellos S., Laiz-Carrión R., et al. Energy metabolism and osmotic acclimation in teleost fish // *Fish Osmoregulation*. Boca Raton: CRC Press, 2019. P. 277–307.
3. Tseng Y.C., Hwang P.P. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2008. V. 148. № 4. P. 419–429.
4. Le François N.R., Blier P.U. Reproductive events and associated reduction in the seawater adaptability of brook charr (*Salvelinus fontinalis*): evaluation of gill metabolic adjustments // *Aquat. Living Resour.* 2003. V. 16. P. 69–76.
5. Le François N.R., Lamarre S.G., Blier P.U. Tolerance, growth and haloplasticity of the Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*) exposed to various salinities // *Aquaculture*. 2004. V. 236. P. 659–675.
6. Чурова М.В., Шульгина Н.С., Немова Н.Н. Активность ферментов энергетического и углеводного обмена в органах колюшки в период нереста из разных биотопов Белого моря // *Доклады Академии наук*. 2018. Т. 482. № 1. С. 111–113.
7. Чурова М.В., Шульгина Н.С., Крупнова М.Ю., и др. Активность ферментов энергетического и углеводного обмена у молоди горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walb.) при переходе из пресной среды в морскую // *Известия Российской академии наук. Серия биологическая*. 2021. № 5. С. 470–478.
8. Gallagher Z.S., Bystriansky J.S., Farrell A.P., et al. A novel pattern of smoltification in the most anadromous

- salmonid: pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 2013. V. 70. № 3. P. 349–357.
9. *Smith L.* Spectrophotometric assay of cytochrome c oxidase // Methods in Biochem. Analysis. 1955. V. 2. P. 427–434.
10. *Колб В.Г., Камышиников В.С.* Клиническая биохимия. Минск: Издательство Беларусь, 1976. 311 с.
11. *Кочетов Г.А.* Практическое руководство по энзимологии. М.: Высш. шк., 1980. 272 с.
12. *Bradford M.A* Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analit. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
13. *Grant A., Gardner M., Nendick L., et al.* Growth and ionoregulatory ontogeny of wild and hatchery-raised juvenile pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) // Canadian Journal of Zoology. 2009. V. 87. № 3. P. 221–228.
14. *Tian W.N., Braunstein L.D., Pang J., et al.* Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 10609–10617.
15. *Gauthier C., Campbell P., Couture P.* Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*) // Comparative Biochemistry and Physiology: Part A. 2008. V. 151. P. 526–532.
16. *Sangiao-Alvarellos S., Laiz-Carrión R., Guzmán J.M., et al.* Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and non-osmoregulatory organs // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2003. V. 285. P. 897–907.

CHANGE IN THE ACTIVITY OF ENZYMES OF ENERGY AND CARBOHYDRATE METABOLISM IN PINK SALMON SMOLTS *ONCORHYNCHUS GORBUSCHA* (WALB.) WITH CHANGE IN ENVIRONMENTAL SALINITY

**N. S. Shulgina, M. V. Kuznetsova*, M. A. Rodin, M. Yu. Krupnova,
D. A. Efremov, S. A. Murzina, Academician of the RAS N. N. Nemova**

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

**e-mail: kuznetsovamvi@yandex.ru*

The activity of key enzymes of energy and carbohydrate metabolism (cytochrome c oxidase (CO), lactate dehydrogenase (LDH), aldolase, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and 1-glycerophosphate dehydrogenase (1-GPDH)) was studied in smolts of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* (Walb.) from the White Sea in a cage experiment simulating its transition from freshwater to marine environment. A decrease in the activity of CO, G6PDH, 1-GPDH and an increase in LDH and aldolase in juveniles with increasing water salinity were revealed. The obtained results allow us to assume that in the studied pink salmon there is a redistribution of energy substrates between the reactions of aerobic and anaerobic metabolism towards an increase in anaerobic ATP synthesis. This may indicate the realization of adaptive mechanisms of metabolic restructuring in pink salmon juveniles, aimed at providing energy for the osmoregulation process when the salinity regime of the habitat changes.

Keywords: pink salmon, enzymes, energy metabolism, salinity, smoltification, White Sea

УДК 577.115.3:595.383.1(261)

СОДЕРЖАНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ИНДЕКСЫ “КАЧЕСТВА ЛИПИДОВ” У АНТАРКТИЧЕСКОГО КРИЛЯ *EUPHAUSIA SUPERBA* ИЗ ТРЕХ РАЙОНОВ АТЛАНТИЧЕСКОГО СЕКТОРА АНТАРКТИКИ

© 2024 г. С. А. Мурзина^{1, *}, В. П. Воронин¹, Д. Г. Битютский^{1, 2},
академик РАН Н. Н. Немова¹

Поступило 15.07.2024 г.

После доработки 11.08.2024 г.

Принято к публикации 17.08.2024 г.

Исследовано содержание общих липидов и жирных кислот в тканях и сегментах тела взрослых особей антарктического криля, отловленных в трех, различающихся по экологическим условиям, районах Атлантического сектора Антарктики. Показаны достоверные отличия тканей и сегментов тела антарктического криля исследуемых регионов по липидному и жирнокислотному статусу. Анализ основных метаболических индексов качества липидов *E. superba* свидетельствует о его высокой пищевой ценности, в том числе, благодаря высокой ненасыщенности его липидов, благоприятных для здоровья человека соотношений физиологически значимых и эссенциальных жирных кислот, что можно рассматривать как отличительную биохимическую характеристику этого вида. Результаты исследования могут быть использованы для формирования научно-обоснованного подхода к дальнейшей технологической обработке криля-сырца и для целевого извлечения отдельных веществ и компонентов липидной природы.

Ключевые слова: биохимический состав, жирные кислоты, антарктический криль, Антарктика

DOI: 10.31857/S2686738924060083

ВВЕДЕНИЕ

Антарктический криль (*Euphausia superba* Dana, 1850) — один из наиболее массовых морских видов отряда Euphausiacea, являющийся важным объектом питания широкого круга организмов низкоширотной морской экосистемы. Криль не только играет важную роль в функционировании экосистем Антарктики и ее пищевой сети [1], но также является частью разнообразных зоопланктонных сообществ: северного океанического с доминирующими видами *Salpa thompson* и *Themisto gaudichaudii*, основного океанического — с веслоногими, *Thysanoessa macrura*

и неритического — *Euphausia crystallorophias* и антарктической серебрянкой *Pleuragramma antarctica* [2]. В связи с важным значением антарктического криля для морской экосистемы Антарктики ее иногда называют “криль-центричной”. Основные скопления антарктического криля отмечаются в Антарктической части Атлантики (АЧА). Благодаря своим огромным запасам и высокой биологической ценности, криль продолжает оставаться одним из важных ресурсов мирового рыболовства [3, 4]. Несмотря на отсутствие промысла этого вида Российской Федерацией (РФ) в последнее десятилетие, антарктический криль остается перспективным объектом промысла в Антарктике для РФ. Лидером промысла антарктического криля является Норвегия, на эту страну за последние десятилетие приходилось от 56 до 71 % всех уловов. Второе место делят между собой Китай (13–25 %) и Республика Корея (8–20 %) (рис. 1).

Следует отметить, что антарктический криль, как правило, рассматривается как объект биотехнологии в ограниченном аспекте (источник белка, каротиноидов и нескольких незаменимых жирных кислот), однако его потенциальная ценность

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

²Федеральное государственное бюджетное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии (ФГБНУ “ВНИРО”),
Москва, Россия

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

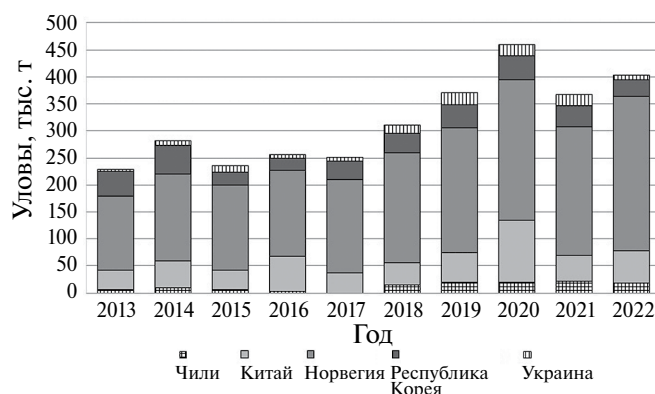


Рис. 1. Промысел антарктического криля в АЧА по странам 2013–2022 гг. согласно данным ФАО (FAO, 2024 [5])

и многовекторность использования как важного природного сырья требуют дополнительных исследований по биохимической характеристике этих видов с целью расширения возможностей их использования. Эти сведения могут иметь значение для развития одного из важных биотехнологических направлений – “морского биопроспектинга”, связанного с целевым использованием морских биоресурсов, основанном на фундаментальных знаниях о структуре, количественном и качественном составе биологически активных макромолекул у гидробионтов.

В рамках настоящего исследования представлены первые данные о содержании жирных кислот в сегментах тела взрослых особей криля – третьем абдоминальном членике, хвосте, а также в гепатопанкреасе, отловленных в январе 2022 года в проливе Брансфилда и Антарктик, а также бассейне Пауэлла моря Уэдделла, вблизи о-вов Джеймса Росса и Шишкова Атлантического сектора Антарктики. Впервые представлена современная оценка пищевой ценности и функциональной значимости для здоровья человека антарктического криля, основанная на анализе набора ключевых метаболических индексов липидного обмена. Результаты исследования могут быть использованы для формирования научно-обоснованного подхода дальнейшей технологической обработки криля-сырца (при получении крилевого масла, муки и др.) и для целевого извлечения отдельных веществ и компонентов липидной природы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отлов антарктического криля проводили в западном секторе АЧА (районы проливов Брансфилда и Антарктик, бассейне Пауэлла моря Уэдделла, вблизи о-вов Джеймса Росса и Шишкова) [6] в рамках 87-го рейса НИС “Академик

Мстислав Келдыш” (АМК-87) в период с 22 января по 12 февраля 2022 г. Материал был получен из ловов двойной квадратной сетью (ДКС) и разноглубинного трала Айзекса-Кидда в модификации Самышева-Асеева (РТАКСА). ДКС имел входное отверстие площадью 1 м² и фильтрующий конус длиной 6 м из газа с размером ячейки 0.5 мм [7]. РТАКСА, не замыкающееся орудие лова с площадью устья 6 м², длиной сетной части 25 м из безузловой дели с ячейей 6 мм и вставкой в кутце из капронового сита № 15 (0.67 мм) [8]. Весь исследуемый антарктический криль был получен с глубин 100–300 м, при скорости движения судна от 2 до 3.3 узлов. Полученный криль незамедлительно транспортировался в лабораторию для дальнейшего анализа.

Препарирование свежельовленных особей и получение отдельных образцов гепатопанкреаса, третьего и хвостового сегмента тела (мышечная ткань) осуществляли на хладагенте в холодной комнате. Образцы до момента доставки в лабораторию сохранялись при температуре –80°C. Далее, проводилась гомогенизация в системе хлороформ: метанол (2:1, по объему). Экстракцию общих липидов (ОЛ) из отобранных образцов проводили по методу Фолча [9]. Качественный и количественный анализ жирных кислот (ЖК) ОЛ проводили методом газовой хроматографии (ГХ), сопряженной с масс-селективным (ГХ-МС) и пламенно-ионизационным (ГХ-ПИД) детектором. Для определения качественного состава полученной смеси метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) проводили их разделение на ГХ с моноквадропольным масс-селективным детектором “Маэстро-αМС” (“Сайтегра”, Россия), где в качестве подвижной фазы использовался гелий, а неподвижной – (88% цианопропил)арил-полисилоксан (хроматографическая колонка HP-88, “Agilent”, США). Полученные данные анализировали с использованием ПО “Маэстро Аналитик v. 1.025” и библиотекой NIST. Количественный анализ осуществляли на ГХ-ПИД “Хроматэк-Кристалл-5000.2” (“Хроматэк”, Россия) при идентичных условиях, однако с использованием азота в качестве подвижной фазы. Обработку полученных результатов проводили в ПО “Хроматэк-Аналитик v. 3.0.298.1”.

На основе полученных ЖК-профилей тканей и сегментов тела криля для определения пищевой и биотехнологической значимости этого вида рассчитаны следующие индексы:

Индекс атерогенности (IA):

$$IA = \frac{[12:0 + (4 \times 14:0) + 16:0]}{(n - 3 \text{ ПНЖК} + n - 6 \text{ ПНЖК} + \text{МНЖК})}$$

где 12:0 – лауриновая кислота, 14:0 – миристиновая кислота, 16:0 – пальмитиновая кислота, n-3 и n-6 ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

“омега-3” и “омега-6” семейств, МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты

Качество липидов рыбы/мяса (FLQ):

$$FLQ = \frac{cis20:5(n-3) + cis22:6(n-3)}{\sum ЖК} \times 100$$

где cis20:5(n-3) – эйкозапентаеновая кислота, cis22:6(n-3) – докозагексаеновая кислота, $\sum ЖК$ – сумма всех жирных кислот

Гипо- и гиперхолестеринемия (НН):

$$НН = \frac{cis18:1 + \sum ПНЖК}{12:0 + 14:0 + 16:0}$$

где cis18:1 – мононенасыщенные жирные кислоты с 18 атомами углерода, $\sum ПНЖК$ – сумма всех полиненасыщенных жирных кислот, 12:0 – лауриновая кислота, 14:0 – миристиновая кислота, 16:0 – пальмитиновая кислота

Индекс укрепления здоровья (НПИ):

$$НПИ = \frac{\sum UFA}{12:0 + (4 \times 14:0) + 16:0}$$

где $\sum UFA$ – сумма всех ненасыщенных жирных кислот, 12:0 – лауриновая кислота, 14:0 – миристиновая кислота, 16:0 – пальмитиновая кислота.

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

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием языка программирования “R” (версия 4.4.1.) в среде разработки “RStudio” (<https://www.posit.co>) с применением дополнительных пакетов: “readxl” (версия 1.4.3.), “tidyverse” (версия 2.0.0.), “vegan” (версия 2.6–6.1) [10]. Для описания количественного содержания ОЛ и индивидуальных ЖК в сегментах тела криля были рассчитаны параметры описательной статистики – среднее арифметическое и его ошибка, дисперсия, распределение выборки. Достоверность различий ($p\text{-value} \leq 0.05$) оценивали с помощью попарного сравнения выборок непараметрическим тестом Вилкоксона–Манна–Уитни. Ординацию районов отлова антарктического криля в многомерном пространстве признаков ЖК профиля для гепатопанкреаса, третьего и хвостового сегмента тела проводили с применением алгоритма неметрического многомерного шкалирования (NMDS). Для определения наилучшей метрики расстояний между исходной и моделируемой матрицами дистанций использовали коэффициент корреляции Спирмена, а оценку меры

расхождений между матрицами осуществляли при помощи показателя “Стресс” [11]. Оценку влияния абиотических факторов среды (температура, соленость, концентрация кислорода и хлорофилла а) на содержание индивидуальных ЖК в разных сегментах тела криля из разных районов вылова проводили с применением канонического анализа соответствий (ССА) [11]. Выявление наилучшей метрики расстояний осуществляли также по коэффициенту Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Известно, что липиды, среди биохимических компонентов криля, характеризуются наибольшей изменчивостью и зависят от размера криля, стадии зрелости, его возраста, пола, а также от сезона, экологических условий района обитания [12, 13].

Достоверно высокое содержание ОЛ (по сравнению с особями других районов) показано для криля в бассейне Пауэлла моря Уэдделла, вблизи о-вов Джеймса Росса и Шишкова: гепатопанкреас – 24.2% сухого вещества, хвостовой и третий абдоминальный сегмент – 16.9% и 16.6% (табл. 1). Количество ОЛ у криля из пролива Брансфилд и пролива Антарктик составило: гепатопанкреас – 9.87% и 8.74%, третий абдоминальный сегмент – 6.79% и 6.39%, хвостовой сегмент – 6.64% и 9.44% соответственно. Отмечено, что высокому содержанию липидов соответствует их меньшая ненасыщенность и напротив меньше содержание липидов отличается высоким содержанием ПНЖК. Так, в порядке убывания (по количеству) ЖК-профиль исследованных тканей и сегментов тела криля в бассейне Пауэлла моря Уэдделла, вблизи о-вов Джеймса Росса и Шишкова представлен: НЖК от 43% до 44.65% от суммы ЖК, ПНЖК от 29.71% до 31.0%, где доминируют (n-3)ПНЖК – 28.36–29.62% при этом (n-6)ПНЖК – 1.35–1.4%, МНЖК составляют от 25.65% до 25.98% от суммы ЖК. Самые ненасыщенные липиды у криля из пролива Брансфилда, где установлено наибольшее содержание ПНЖК (за счет (n-3) ПНЖК) – от 43.55% до 48.% (от 41.14% до 46.48%), далее следуют МНЖК – от 20.23% до 24.75% и затем НЖК – от 29.87% до 31.17%.

Ранее [12] обсуждалось, что при повышении уровня липидов в криле ненасыщенность, устойчивость к окислению снижается, тем самым снижается и пищевая ценность. Несмотря на установленные различия содержания ПНЖК у антарктического криля из разных районов, их уровень высокий, а доминирование (n-3)ПНЖК, обладающих широким спектром положительных биологических эффектов и физиологических функций на организм, определяет пищевую значимость антарктического криля в профилактике нарушений обмена липидов, связанных с их экзогенным поступлением.

Таблица 1. Содержание общих липидов (% сухого вещества) и жирных кислот (% суммы ЖК) в гепатопанкреасе (Г), третьем абдоминальном (ЗАС) и хвостовом сегменте (ХС) у антарктического криля из трех районов Атлантического сектора Антарктики

Район	Пролив Брансфилда			Пролив Антарктик			бассейн Пауэлла моря Уэдделла		
ОЛ/ЖК	Г	ЗАС	ХС	Г	ЗАС	ХС	Г	ЗАС	ХС
ОЛ	9.87±0.96	6.79±0.39	6.64±0.5	8.74±0.46	6.39±0.07	9.44±1.27	24.24±1.25	16.56±1.33	16.97±1.23
12:0	0.08±0.01	0.01±0.01	0.04±0.02	0.06±0.03	0.08±0.01	0.08±0.04	0.12±0.01	0.11±0.01	0.12±0.01
13:0	0.04±0.01	0±0	0.02±0.01	0±0	0±0	0.02±0.01	0.04±0.01	0.02±0.01	0.03±0.01
14:0	4.57±0.68	3.87±0.42	4.13±0.62	7.45±0.94	5.64±0.23	6.8±0.46	9.6±0.42	8.84±0.35	9.54±0.39
15:0	0.31±0.03	0.23±0.03	0.24±0.04	0.18±0.04	0.16±0.02	0.18±0.02	0.19±0.03	0.19±0.03	0.19±0.03
iso15:0	0.1±0.02	0.02±0.01	0.06±0.02	0.06±0.03	0.03±0.02	0.08±0.02	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01
anteiso15:0	0.07±0.01	0.01±0.01	0.05±0.02	0.03±0.02	0±0	0.04±0.02	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01
16:0	19.44±0.56	20.61±0.32	19.86±0.44	21.07±0.99	20.14±0.63	21.11±0.41	21.67±0.17	21.11±0.35	21.46±0.26
iso16:0	0.08±0.02	0.01±0.01	0.04±0.02	0±0	0±0	0.01±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01
17:0	0.12±0.02	0.11±0.03	0.09±0.02	0.01±0.01	0.02±0.02	0.04±0	0.03±0.01	0.04±0.01	0.03±0.01
iso17:0	0.23±0.03	0.11±0.03	0.17±0.03	0.09±0.03	0.09±0.02	0.11±0.01	0.12±0.02	0.12±0.01	0.13±0.02
18:0	1.85±0.18	3.7±0.45	2.35±0.23	3.56±0.94	4.7±0.42	3.6±0.38	3.11±0.16	3.75±0.19	3.33±0.13
19:0	0.08±0.01	0.21±0.04	0.1±0.02	0.11±0.08	0.16±0.03	0.08±0.02	0.03±0	0.08±0.02	0.05±0.01
20:0	1.36±0.1	3.22±0.26	2.11±0.28	6.69±3.48	11.92±2.14	7.98±1.52	6.56±0.36	8.47±1.15	7.35±0.49
21:0	0.01±0	0±0	0±0	0.07±0.04	0.21±0.08	0.1±0.03	0.09±0.01	0.12±0.02	0.09±0.01
23:0	1.2±0.65	1.88±0.54	1.49±0.36	1.11±0.29	0.47±0.04	0.43±0.25	0.04±0.01	0.05±0.02	0.04±0.01
24:0	0.28±0.02	0.66±0.07	0.39±0.07	1.27±0.65	2.18±0.35	1.48±0.26	1.23±0.07	1.59±0.22	1.37±0.09
cis14:1(n-5)	0.09±0.04	0±0	0.03±0.01	0.02±0.01	0±0	0.03±0.01	0.1±0.01	0.09±0.01	0.09±0.01
cis16:1(n-7)	4.54±1.16	4.01±0.94	3.27±0.44	6.75±0.64	5.17±0.06	6.38±0.1	6.09±0.28	6.16±0.31	6.18±0.31
cis17:1(n-7)	0.47±0.13	0.13±0.09	0.12±0.09	0.63±0.33	0.76±0.03	0.99±0.02	0.7±0.05	0.67±0.05	0.72±0.05
trans18:1(n-9)	0.13±0.03	0.08±0.04	0.1±0.03	0.05±0.03	0.05±0	0.08±0.01	0.06±0.01	0.06±0	0.06±0.01
cis18:1(n-9)	10.07±1.43	10±0.88	8.48±0.49	11.42±0.73	9.24±0.53	10.68±0.22	12.98±0.38	12.91±0.5	13.01±0.47
cis18:1(n-7)	8.71±0.46	6.99±0.34	7.7±0.47	4.64±0.28	4.27±0.27	4.46±0.12	4.92±0.11	4.67±0.12	4.68±0.1
cis20:1(n-9)	0.62±0.09	0.57±0.1	0.48±0.06	0.63±0.03	0.51±0.04	0.58±0.05	1.03±0.06	0.99±0.07	0.97±0.06
cis24:1(n-9)	0.12±0.02	0.02±0.01	0.05±0.02	0.06±0.03	0.01±0.01	0.08±0.02	0.11±0.01	0.09±0.01	0.09±0
cis18:2(n-6)	1.57±0.14	1.64±0.11	1.73±0.1	0.93±0.12	0.9±0.1	0.92±0.07	1.25±0.14	1.2±0.13	1.24±0.15
cis18:3(n-6)	0.1±0.02	0.05±0.02	0.08±0.02	0.08±0.05	0±0	0.09±0.01	0.09±0.01	0.07±0.01	0.07±0.01
cis20:2(n-6)	0.14±0.02	0.57±0.24	0.17±0.02	0.07±0.07	0.14±0.14	0.03±0.01	0.05±0	0.06±0.01	0.05±0.01
cis20:4(n-6)	0.13±0.04	0.15±0.04	0.13±0.03	0.05±0.02	0.06±0.04	0.05±0.01	0.01±0	0.02±0.01	0.02±0
cis18:3(n-3)	0.98±0.15	0.88±0.14	1.03±0.13	0.4±0.08	0.45±0.07	0.44±0.06	0.68±0.06	0.62±0.08	0.64±0.07
cis18:4(n-3)	2.12±0.39	1.79±0.32	2.06±0.39	2.35±0.35	1.87±0.21	2.27±0.32	3.75±0.36	3.28±0.34	3.48±0.38
cis20:5(n-3)	23.84±1.47	20.61±1.12	23.86±0.73	21.8±0.57	20.2±0.33	21.44±0.83	17.09±0.57	15.79±0.7	16.15±0.6
cis22:5(n-3)	0.67±0.06	0.58±0.04	0.63±0.04	0.37±0.03	0.39±0.02	0.37±0.03	0.29±0.01	0.3±0.02	0.3±0.02
cis22:6(n-3)	15.78±1.6	17.29±0.84	18.89±1.39	8.01±0.79	10.14±1.17	8.97±0.83	7.79±0.38	8.37±0.58	8.34±0.54
НЖК	29.87±0.88	34.66±0.8	31.17±1.01	41.76±3.4	45.82±2.12	42.13±1.74	43±0.3	44.64±1.11	43.9±0.54
МНЖК	24.75±2.83	21.8±1.78	20.23±1.32	24.19±1.47	20.01±0.79	23.29±0.23	25.98±0.61	25.65±0.81	25.8±0.73
(n-3) ПНЖК	43.43±2.88	41.14±2.07	46.48±1.92	32.93±1.76	33.05±1.55	33.5±1.71	29.62±0.55	28.36±1.03	28.91±0.86
(n-6) ПНЖК	1.95±0.17	2.41±0.26	2.12±0.13	1.13±0.25	1.12±0.24	1.09±0.09	1.4±0.14	1.35±0.15	1.39±0.16
ПНЖК	45.38±2.92	43.55±2.1	48.6±1.93	34.06±2	34.17±1.64	34.58±1.77	31.02±0.65	29.71±1.15	30.3±1
IA	0.54	0.55	0.53	0.87	0.79	0.84	1.05	1.02	1.06
FLQ	16.02	37.9	42.75	29.81	30.34	30.41	24.88	24.16	24.49
HN	2.67	2.48	2.7	1.75	1.85	1.78	1.56	1.58	1.54
HPI	1.82	1.81	1.88	1.14	1.27	1.20	0.94	0.98	0.94

Установлено, что ЖК-профиль исследованных тканей и сегментов криля характеризуется высоким разнообразием, но в минорном количестве, короткоцепочечных и среднецепочечных ЖК, с нечетным числом атомов углерода в цепи, а также наличием форм изо- и антеизоразветвленных

кислот, которые отражают прямое или чаще опосредованное присутствие бактерий в питании *E. superba*. Гепатопанкреас, третий абдоминальный и хвостовой сегменты различаются друг от друга набором отдельных ЖК, что связано в первую очередь с отличием этих тканей по метаболической

нагрузке и функциональной роли в организме. Наряду с этим ткани крыла также различаются количественно, что указывает на влияние экзогенных факторов, таких как трофический фактор (доступность, разнообразие пищи и др.). Так, трофический маркер зоопланктона — 20:1(n-9) кислота изменяется исключительно количественно среди исследованных тканей. Недавние исследования [14] демонстрируют, что (n-9)МНЖК способствуют более полному проявлению биологических эффектов (n-3)ПНЖК в организме атлантического лосося и клеточных линий печени человека. Проведенный нами канонический анализ соответствий (ССА) показал влияние ключевых абиотических факторов (температура, соленость, концентрация кислорода и хлорофилла а) на ЖК-профиль крыла, тем самым подтверждая различия липидного и ЖК состава у особей из разных регионов (рис. 2).

В этой связи следует отметить, что такие эссенциальные ЖК как линолевая кислота 18:2(n-6), α -линоленовая кислота 18:3(n-3), которые являются основоположниками физиологически значимых классов (n-6) и (n-3)ПНЖК и эндогормонов липидной природы — эйкозаноидов, а также физиологически значимые для любого организма эйкозапентаеновая кислота 20:5(n-3), ЭПК, и докозагексаеновая кислота 22:6(n-3), ДГК, также количественно различаются в исследованных тканях и сегментах крыла.

Согласно результатам анализа NMDS по количественному содержанию ЖК гепатопанкреас крыла из пролива Брансфилда отличается от такового бассейна Пауэлла моря Уэдделла, при этом особи из пролива Антарктик занимают промежуточное положение. Интересно, что ЖК-профили третьего абдоминального и хвостового сегмента различаются, формируя отдельные скопления данных. Считается [15], что ЖК-профиль третьего абдоминального сегмента является “аккумулятором” ЖК-трофических биомаркеров, тем самым отражая кратковременную и долговременную взаимосвязь с трофическими условиями региона обитания крыла [6,13]. В нашем исследовании показано, что расположение данных содержания ЖК, в том числе биомаркерных, на плоскости двух главных осей NMDS действительно указывает на достоверные отличия таковых в третьем абдоминальном сегменте крыла (рис. 3). Так, сформированы три отдельных, непересекающихся облака данных, что указывает на достоверные отличия основных ЖК в мышцах этого сегмента и тесную связь с экологическими факторами региона обитания.

Современная оценка пищевой ценности и качества липидов сырья и пищи основывается на расчете и анализе набора, т.н. метаболических индексов или пищевых индексов: ПНЖК/НЖК, индекс атерогенности (IA), индекс

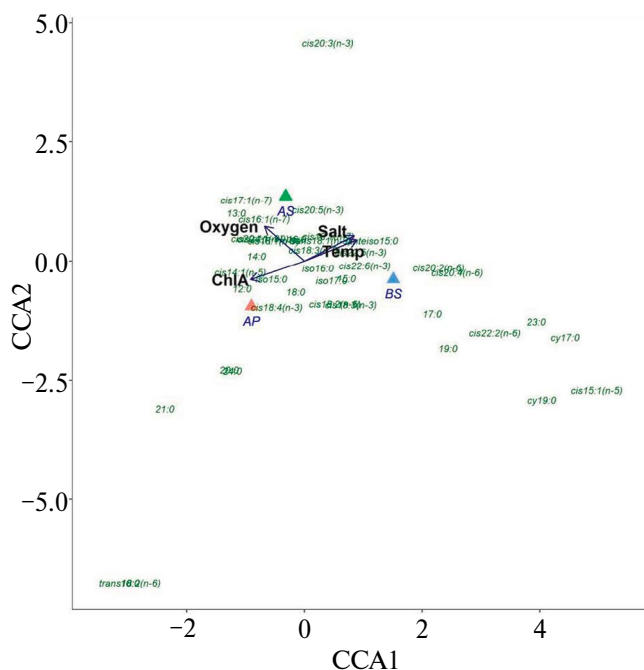


Рис. 2. Зависимость содержания жирных кислот в тканях и сегментах антарктического крыла из трех регионов Атлантического сектора Антарктики от ключевых абиотических факторов (температура, соленость, концентрация кислорода и хлорофилла а) с применением канонического анализа соответствий (ССА).

Примечание: “синий треугольник” — пролив Брансфилда (BS), “красный треугольник” — полуостров Антарктический (AP), “зеленый треугольник” — пролив Антарктик (AS).

тромбогенности (IT), индекс гипо-/гиперхолестеринемии (НН), индекс укрепления здоровья (НPI), качество липидов рыбы или мяса (FLQ) [16]. В основе каждого из этих индексов лежит оценка количественного соотношения ЖК, преимущественно МНЖК и ПНЖК, индивидуальных ЖК этих классов, а также НЖК (высокий уровень которых рассматривается как фактор риска здоровья), с учетом их известных функций в метаболизме человека, биологических эффектов и роли в борьбе с нарушениями обмена веществ в организме. Среди таковых доказанных свойств следует упомянуть общеукрепляющие, иммуномодулирующие, противовоспалительные и противораковые, способность к повышению инсулинорезистентности, кроме того, известно, что несбалансированное питание по липидным компонентам может приводить к нарушениям развития, когнитивным расстройствам и развитию сердечно-сосудистых заболеваний, ССЗ [16].

Индекс качества липидов (FLQ) у антарктического крыла из всех трех биотопов характеризовался очень высокими значениями (пролив

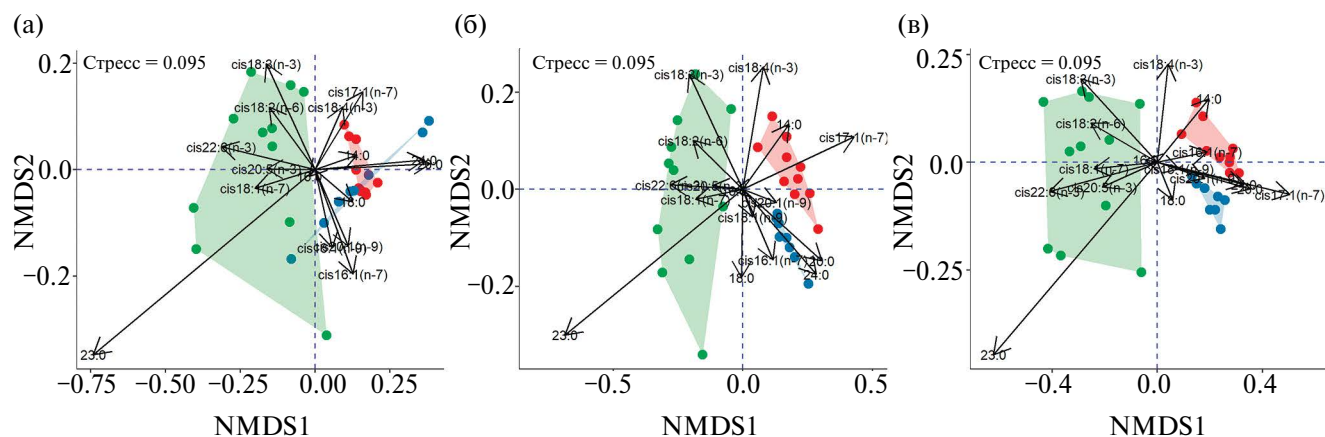


Рис. 3. Расположение данных содержания ЖК в тканях и сегментах антарктического криля из трех регионов Атлантического сектора Антарктики на плоскости двух главных осей NMDS.

Примечание к рисунку NMDS: “А” — гепатопанкреас, “В” — 3-й абдоминальный сегмент, “С” — хвостовой сегмент; “зеленая область” — пролив Брансфилда (BS), “красная область” — полуостров Антарктический (AP), “синяя область” — пролив Антарктик (AS).

Брансфилда: от 16.0 до 42.7, пролив Антарктик: от 29.8 до 30.4, бассейн Пауэлла море Уэдделла: от 24.2 до 24.9) за счет большого содержания эссенциальных 20:5(n-3) и 22:6(n-3) кислот, что подтверждает высокую пищевую ценность этого вида (табл. 1). Обнаружено, что значения этого индекса слабо различались среди исследованных органов за исключением гепатопанкреаса особей из пролива Брансфилда (16.0). Индекс атерогенности (IA), один из самых распространенных для оценки пищевой ценности продукта, поскольку отражает потенциальную агрегацию тромбоцитов в сосудах (за счет биологической активности и участия данных ЖК в этих процессах), снижение накопления холестерина и этерифицированных жирных кислот. Считается, что данный показатель ниже у продуктов, ранжируемых как “здоровая еда”, для мяса этот показатель варьирует в пределах от 0.165 до 1.32, а для усредненной группы “ежедневно потребляемая пища” — от 1.42 до 5.13. В нашем исследовании, показано, что IA различается у криля из разных регионов, но не различается в зависимости от части тела (пролив Брансфилда — 0.5, пролив Антарктик — 0.8, бассейн Пауэлла море Уэдделла — 1.0), при этом значения индекса благоприятно низкие — от 0.53 до 1.06 (табл. 1). Близкие значения IA показаны для креветки *Penaeus notialis* (0.71–0.82), таких видов рыб как атлантическая сельдь *Clupea harengus* (0.70), короткоперая корвина *Cynoscion parviinnis* (1.07–1.16), некоторые виды бурых и зеленых водорослей [16]. Пища со схожим и более низкими значениями индекса IA способствует снижению риска ССЗ, однако пределы значений данного индекса в качестве рекомендованных для поддержания здоровья человека продолжают оставаться дискуссионными. Индекс гипо-/гиперхолестеринемии

(НН) часто обсуждается в комплексе с IA, его значения для антарктического криля из разных районов различался — от 1.75 (пролив Антарктик) до 2.7 (пролив Брансфилда) и схож с таковым для морепродуктов (моллюски, креветки). Различия этого индекса между тканями и сегментами тела криля в пределах одного региона незначительны. “Здоровье-улучшающий” индекс (health-promoting index, HPI) [17], который непосредственно обозначает вклад ЖК продукта в борьбе с ССЗ, также не различался между тканями и сегментами тела криля в пределах одного региона: был наибольшим по величине у особей из пролива Брансфилда (2.5–2.7) и наименьшим у криля в бассейне Пауэлла моря Уэдделла, вблизи о-вов Джеймса Росса и Шишкова (0.94–0.98). Большинство употребляемых в пищу молочных продуктов имеют значения этого индекса в пределах от 0.16 до 0.68, при этом, чем более высокие значения индекса, тем полезнее продукт [16].

Таким образом, в настоящей работе показаны достоверные отличия антарктического криля по содержанию общих липидов и жирных кислот в его тканях (гепатопанкреас, мышцы) и сегментах тела, что связано с различиями экологических условий обитания в исследованных регионах Атлантического сектора Антарктики (рис. 4).

При этом трофический фактор во многом определяет наличие или отсутствие специфических жирных кислот пищевого происхождения, например (n-9) моновенасыщенных жирных кислот.

Тем самым для целевого извлечения отдельных компонентов липидной природы, индивидуальных ЖК и их сочетаний, с целью производства медицинских, парфюмерно-косметических

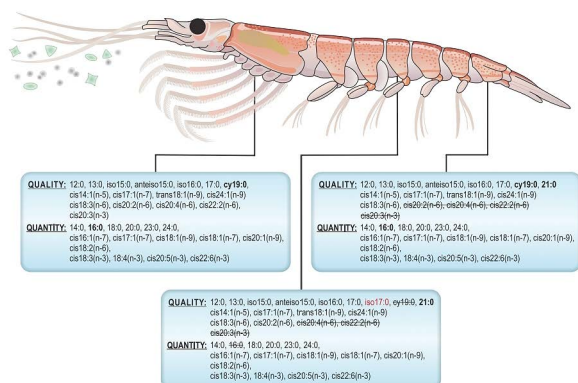


Рис. 4. Обобщенная схема профиля жирных кислот их различий по качественному и количественному составу (% суммы ЖК) в гепатопанкреасе, третьем абдоминальном и хвостовом сегменте у антарктического криля из исследованных биотопов.

Примечание: красным шрифтом выделена жирная кислота, которая встречается только в третьем абдоминальном сегменте, зачеркнутый шрифт для жирных кислот, которые не обнаружены в данной ткани или сегменте по сравнению с другими

препаратов, а также получения функциональных пищевых ингредиентов может быть рекомендована сепаратная обработка криля. Анализ основных метаболических индексов качества липидов *E. superba* свидетельствует о его высокой пищевой ценности, в том числе, благодаря высокой ненасыщенности его липидов, благоприятных для здоровья человека соотношений физиологически значимых и эссенциальных жирных кислот, что можно рассматривать как отличительную биохимическую характеристику этого вида. Установлено, что значения рассчитанных индексов не различаются между исследованными тканями и сегментами тела криля, что позволяет их совместно использовать при комплексной обработке криля с целью получения некоторых кормовых и технических продуктов. При этом необходимо учитывать регион отбора образцов для данной технологической переработки.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубочайшую благодарность административному корпусу рейса АМК-87, а также экипажу НИС «Академик Мстислав Келдыш» за всестороннюю помощь и поддержку в ходе выполнения экспедиционных работ и исследований. Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам ИО РАН А. М. Орлову, А. В. Мишину, К. В. Минину и В. Л. Семину за профессиональное проведение траловых работ и помощь в разборе материала.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа проведена в рамках государственного задания КарНЦ РАН FMEN-2022-0006.

СОБЛЮЖДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ.

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

КОНФЛИКТЕ ИНТЕРЕСОВ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Trathan P.N., Hill S.L.* The importance of krill predation in the Southern Ocean. // *Biology and ecology of Antarctic krill. Advances in Polar Ecology.* / Ed Siegel V. Springer: Cham, 2016. P. 321–350.
2. *Siegel V., Watkins J.L.* Introducing Antarctic Krill *Euphausia superba* Dana, 1850 // *Biology and ecology of Antarctic krill. Advances in Polar Ecology.* / Ed Siegel V. Springer: Cham, 2016. P. 1–20.
3. *Сологуб Д.О.* Современные особенности распределения, биологии и горизонтальных миграций антарктического криля (*Euphausia superba*) в Атлантическом секторе Антарктики: дис. канд. биол. наук. М.: Изд-во ВНИРО, 2016. 247 с.
4. *Nicol S., Foster J.* The fishery for Antarctic krill: its current status and management regime // Siegel V. (eds.). *Biology and ecology of Antarctic krill. Advances in Polar Ecology.* Springer, Cham. 2016. P. 387–421.
5. FAO. 2024. FishStat: Global production by production source 1950–2022. [Accessed on 29 March 2024]. In: FishStatJ. Available at www.fao.org/fishery/en/statistics/software/fishstatj. Licence: CC-BY-4.0.
6. *Bitiutskii D.G., Samyshev E.Z., Minkina N.I., Melnikov V.V., Chudinovskikh E.S., Usachev S.I., Salyuk P.A., Serebrennikov A.N., Zuev O.A., Orlov A.M.* Distribution and demography of Antarctic krill and salps in the Atlantic sector of the Southern Ocean during austral summer 2021–2022 // *Water*. 2022. Vol. 14. P. 3812.
7. *Bouchard C., Mollard S., Suzuki K., Robert D., Fortier L.* Contrasting the early life histories of sympatric Arctic gadids *Boreogadus saida* and *Arctogadus glacialis* in the Canadian Beaufort Sea // *Polar Biol*. 2016. Vol. 39. № 6. P. 1005–1022.
8. *Kobyliansky S.G., Orlov A.M., Gordeeva N.V.* Composition of deepsea pelagic ichthyocenes of the Southern

- Atlantic, from waters of the range of the Mid-Atlantic and Walvis Ridges. // J. Ichthyol. 2010. Vol. 50. № 10. P. 932–949.
9. Folch J., Lees M., Sloan-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids animal tissue (for brain, liver and muscle) // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226. P. 497–509.
 10. Кабаков Р.И. R в действии: Анализ и визуализация данных в программе. М.: ДМК Пресс, 2016. 580 с.
 11. Толстов Ю.Н. Основы многомерного шкалирования: учебное пособие. М.: КДУ, 2006. 160 с
 12. Антарктический криль. Справочник. / Под ред. Быковой В.М. М.: Издательство ВНИРО, 2001. 207 с.
 13. Murzina S.A., Voronin V.P., Bitiutskii D.G., Mishin A.V., Khurtina S.N., Frey D.I., Orlov A.M. Comparative Analysis of the Fatty Acid Profiles of Antarctic Krill (*Euphausia superba* Dana, 1850) in the Atlantic Sector of the Southern Ocean: Certain Fatty Acids Reflect the Oceanographic and Trophic Conditions of the Habitat // J. Mar. Sci. Engin. 2023. Vol. 11. №10. P. 1912.
 14. Østbye T.-K. K., Berge G.M., Nilsson A., Romarheim O.H., Bou M., Ruyter B. The long-chain monounsaturated cetoleic acid improves the efficiency of the n-3 fatty acid metabolic pathway in Atlantic salmon and human HepG2 cells // British J. Nutr. 2019. P. 1–14.
 15. Schmidt K., Atkinson A., Stubing D., McClelland J.W., Montoya J.P. Trophic relationships among Southern Ocean copepods and krill: some uses and limitations of a stable isotope approach // Limnol. Oceanogr. 2003. Vol. 48. №1. P. 277–289.
 16. Chen J., Liu H. Nutritional indexes for assessing fatty acids: a mini-review // Int. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21. № 16. P. 5695.
 17. Chen S., Bobe G., Zimmerman S., Hammond E.G., Luthman C.M., Boylston T.D., Freeman A.E., Beitz D.C. Physical and sensory properties of dairy products from cows with various milk fatty acid compositions. // J. Agric. Food Chem. 2004. Vol. 52. P. 3422–3428.

THE CONTENT OF FATTY ACIDS AND NUTRITIONAL INDEXES OF LIPIDS OF THE ANTARCTIC KRILL *EUPHAUSIA SUPERBA* COLLECTED FROM THREE REGIONS OF THE ATLANTIC SECTOR OF ANTARCTIC

S. A. Murzina^a, V. P. Voronin^a, D. G. Bitiutskii^{a, b}, Academician of the RAS N. N. Nemova^a

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

^b*Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (FSBSI “VNIRO”), Moscow, Russian Federation*

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

The content of total lipids and fatty acids in tissues and body segments of adult Antarctic krill caught in three regions of the Atlantic sector of Antarctica, differing in environmental conditions, was studied. Significant differences in terms of lipid and fatty acid status of the Antarctic krill tissues and body segments in studied regions were shown. Analysis of the main metabolic indices of the *E. superba* lipids quality testifies to its high nutritional value, including due to the high unsaturation of its lipids, favorable ratios of physiologically significant and essential fatty acids for human health, which can be considered as a distinctive biochemical characteristic of this species. The results of the study can be used to form a scientifically based approach to further technological processing of raw krill and for the targeted extraction of certain substances and components of a lipid nature.

Keywords: biochemical content, fatty acids, Antarctic krill, Antarctic

УДК:577.115:597.553.1/.554.5(261.1)

РОЛЬ ЗАПАСНЫХ ЛИПИДОВ ПРИ ВЕРТИКАЛЬНЫХ МИГРАЦИЯХ ОКУНЯ-КЛЮВАЧА (*SEBASTES MENTELLA*) СЕВЕРНОЙ АТЛАНТИКИ

© 2024 г. В. П. Воронин^{1, *}, А. Ю. Рольский², А. М. Орлов^{3, 4}, С. А. Мурзина¹

Представлено академиком РАН Н.Н. Немовой

Поступило 16.08.2024 г.

После доработки 22.08.2024 г.

Принято к публикации 23.08.2024 г.

Исследовано содержание основных классов запасных липидов — триацилглицеринов, эфиров холестерина и восков — в мышцах и печени окуня-клювача (*Sebastes mentella*), а также их изменение в градиенте глубин и в разных районах Северной Атлантики. Установлены достоверные различия по количественному содержанию запасных липидов у морских окуней из разных горизонтов лова. Проанализированные изменения липидов в тканях и органах рыб при увеличении глубины свидетельствуют об использовании триацилглицеринов, эфиров холестерина и восков в качестве энергетических источников, в том числе для поддержания плавучести организма при вертикальных перемещениях. Результаты исследования могут быть основой для дальнейшего изучения биохимических механизмов миграций коммерчески ценного промыслового вида морских окуней Северной Атлантики — окуня-клювача, а также других гидробионтов со схожей двигательной активностью.

Ключевые слова: липиды, окунь-клювач, мезопелагическая зона, эколого-биохимические адаптации, вертикальные миграции, Северная Атлантика

DOI: 10.31857/S2686738924060093

ВВЕДЕНИЕ

Вертикальные миграции — эволюционно сложившаяся модель поведения гидробионтов, в том числе рыб, которая основана на изменении глубины обитания в течение суток или в процессе

онтогенетического развития [1]. Экологическое значение таких перемещений заключается в (1) снижении прямого воздействия хищных видов на виды-жертвы и (2) обеспечении эффективного освоения пищевых ресурсов различных биотопов, что способствует формированию экологической диверсификации глубоководных организмов [2]. В процессе эволюции рыб действие совокупности внешних факторов на организм послужило стимулом для формирования комплекса приспособительных реакций на разных уровнях организации живого, в том числе на биохимическом. Одним из важнейших, и при этом наименее изученных компенсаторных механизмов эколого-биохимических адаптаций, является накопление и изменение в теле рыб таких многофункциональных веществ, как липиды [3]. Известно, что накопление и изменение в теле рыб запасных липидов с низкой плотностью является, в том числе, адаптацией к длительному обитанию в толще воды [4]. При этом некоторые классы липидов могут прямо или опосредованно участвовать в процессах поддержания и регуляции плавучести особей во время осуществления вертикальных миграций [5–7].

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

²Полярный филиал ФГБНУ “Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии” (“ПИНРО” им. Н.М. Книповича), Мурманск, Россия

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Институт океанологии им. П.П. Ширинова Российской академии наук”, Москва, Россия

⁴Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук”, Москва, Россия

*E-mail: voronen-viktor@mail.ru

Окунь-клювач (клюворылый окунь, *Sebastes mentella*, сем. Sebastidae) является ярким представителем глубоководных вертикально-мигрирующих организмов, вертикальное распределение которого в Северной Атлантике (море Ирмингера и сопредельные воды) составляет от 0–50 метров до 1100 метров [8]. Большая продолжительность жизни морских окуней, а также специфика репродуктивной биологии (например, внутреннее оплодотворение, яйцеживорождение и вымет личинок в верхней эпипелагиали) способствовали формированию компенсаторных реакций в широком диапазоне глубин [8], в том числе на уровне липидного обмена. Ввиду высокой коммерческой ценности клюворылого окуня изучение липидного профиля данного вида осуществлялось в основном с позиции оценки значимости и распределения его промысловых скоплений в районах Северной Атлантики [9]. Однако исследований по участию компонентов липидной природы в эколого-биохимических адаптациях к глубоководным условиям обитания до сих пор не проводилось. Ранее [10] нами уже был описан полный липидный профиль мышечной ткани

окуня-клювача из моря Ирмингера. Известно, что основным способом изменения плавучести у клюворылого окуня при вертикальных перемещениях является газорегуляция плавательного пузыря [11], однако некоторые исследования [12] указывают на слабые акустические изменения (следовательно, изменения объема плавательного пузыря) при миграциях окуня в диапазоне до 100 метров. В работе Готье и Роуз (Gauthier, Rose) [12] высказана гипотеза об эндогенном цикле рассасывания и секреции газов плавательного пузыря при изменении глубины. В настоящей работе изучены биохимические механизмы поддержания плавучести клюворылого окуня (*S. mentella*) с участием запасных липидов, которые способствуют вертикальным миграциям окуня в пределах мезопелагиали Северной Атлантики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор образцов тканей окуня-клювача (*S. mentella*) осуществляли в период проведения тралово-акустической съемки в море Ирмингера и смежной

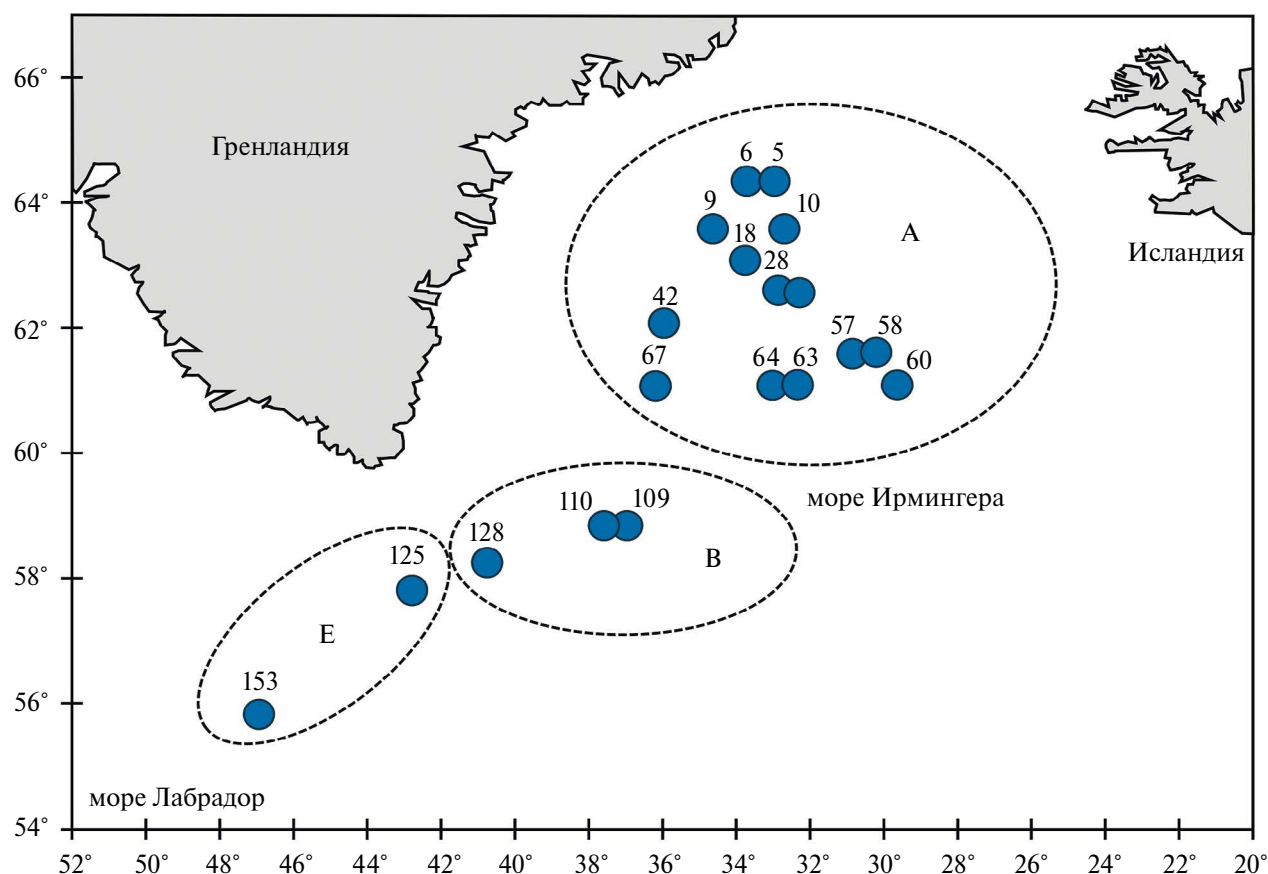


Рис. 1. Карта-схема района сбора проб окуня-клювача (*Sebastes mentella*) в период МТАС 2021.

Примечание: Цифрами указаны номера тралов. Подрайон “А” — северо-восточный район исследований, подрайон “В” — юго-восточный район исследований; подрайон “Е” — юго-западный район исследований [13].

акватории моря Лабрадор (Северная Атлантика) в летний сезон (июнь–август 2021 г.) на борту научно-исследовательского судна “Атлантида” (рис. 1). Отлов рыбы проводили разноглубинным тралом 78.7/416 м, черт. 2492–02, с мешком черт. 2539–00. Внутренний размер ячеи тралового мешка 125 мм, мешок с мелкоячейной вставкой с внутренним размером ячеи 16 мм. В соответствии с методикой выполнения съемки [13], выполняли три типа тралений: (1) в акустическом слое водной толщи на скоплениях окуня, которого возможно идентифицировать акустическим способом; (2) от верхней кромки звукорассеивающего слоя до глубины 500 метров; (3) на глубине более 500 метров (табл. 1).

На биохимический анализ липидов у 143 особей окуня-клювача (66 самцов и 77 самок) были отобраны фрагменты мышечной ткани и печени (табл. 1). Навеску тканей (2–3 г) индивидуально фиксировали при -80°C в низкотемпературном морозильнике Eppendorf CryoCube F101h (Германия) до последующей транспортировки в лабораторию. Биохимические исследования выполняли на базе лаборатории экологической биохимии и с использованием оборудования Центра коллективного пользования КарНЦ РАН.

Экстракцию общих липидов (ОЛ) из предварительно гомогенизированных тканей мышц и печени проводили по методу Фолча [14] смесью хлороформ-метанол (2:1 по объему). Далее полученные экстракты ОЛ подвергались

хроматографическому разделению на отдельные классы липидов.

Качественное и количественное определение нейтрально заряженных молекул триацилглицеринов (ТАГ), эфиров холестерина (ЭХС) и восков проводили методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии с использованием комплекса оборудования CAMAG (Швейцария). Фракционирование ОЛ осуществляли на ультратонких хроматографических пластинках на стеклянной основе – HPTLC Silicagel 60 F₂₅₄ Premium Purity (“Merck”, Германия). При помощи полуавтоматического аппликатора Linomat 5 (“CAMAG”, Швейцария) наносили микроколичество пробы (2 мкл) штриховым методом, а разделение ОЛ на липиды разных классов проводили в автоматической хроматографической камере для элюирования ADC2 (“CAMAG”, Швейцария) с использованием системы растворителей “гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота” (32.0:8.0:0.8 по объему) [15]. Окраску липидных пятен осуществляли в герметичном дериватизаторе (“CAMAG”, Швейцария) путем распыления через форсунку 2 мл водного раствора медного купороса (CuSO_4), подкисленного ортофосфорной кислотой (H_3PO_4), с последующим нагреванием пластины до 160°C в течение 15 минут для визуального проявления окрашенных пятен. Сканирование окрашенной хроматографической пластины выполняли в камере денситометра TLC Scanner 4 (“CAMAG”, Швейцария) в режиме адсорбции при длине волны 360 нм.

Таблица 1. Характеристика образцов клюворылого окуня (*Sebastes mentella*), отобранных на анализ липидов

Дата	№ трала	Подрайон вылова	Глубина траления, м	Длина, мм min-max	Масса, г min-max	Самки	Самцы
18.06.21	5	А	550–850	360–450	526–992	4	1
18.06.21	6	А	350–450	370–410	568–890	1	1
19.06.21	9	А	320–450	310–410	382–798	3	2
19.06.21	10	А	350–450	320–370	340–594	6	5
22.06.21	18	А	270	310–360	354–584	5	5
25.06.21	28	А	550–850	330–430	394–1022	10	10
25.06.21	29	А	330–450	320–380	372–636	5	5
04.07.21	57	А	550–850	340–440	494–1060	3	3
04.07.21	58	А	320–450	400	832	1	
05.07.21	60	А	550–850	390–410	766–880	1	1
06.07.21	63	А	550–850	350–420	546–948	1	6
06.07.21	64	А	320–450	330–390	450–668	1	4
07.07.21	67	А	330–450	340–380	488–690	10	0
27.07.21	109	В	320–450	320–390	418–722	6	5
27.07.21	110	В	550–850	320–390	418–784	5	5
01.08.21	125	Е	550–850	340–390	502–712	5	5
02.08.21	128	В	300–450	320–370	418–606	5	5
11.08.21	153	Е	400–450	340–380	474–708	5	3

Примечание: расшнуровка районов и координаты тралов представлены на рис. 1.

Качественное и количественное определение липидных компонентов проводили с учетом соответствия значений коэффициента подвижности аналитических стандартов ТАГ, ЭХС и восков (“Sigma-Aldrich”, США).

Статистическую обработку результатов проводили на языке программирования R (версия 4.4.1.) в среде разработки RStudio (<https://www.posit.co>) с использованием дополнительных пакетов: “readxl” (версия 1.4.3.), “tidyverse” (версия 2.0.0.), “vegan” (версия 2.6–6.1). Для данных, сгруппированных по району обитания окуня-клювача, глубине его вылова, полу и исследуемой ткани/органу была рассчитана описательная статистика — среднее арифметическое и его ошибка, дисперсия, распределение выборки. Достоверность различий между группами выборок оценивали с помощью непараметрического теста Вилкоксона—Манна—Уитни, а также с применением перестановочного многомерного дисперсионного анализа с использованием матриц расстояний (ADONIS). Различия считали достоверными при $p\text{-value} \leq 0.05$. Корреляционный анализ (r) проводили по Спирмену, а качественную оценку тесноты связи определяли по шкале Чеддока. Статистический анализ сходства между самцами и самками по накоплению липидов в печени осуществляли с использованием алгоритма ANOSIM (R). Ординацию глубины и районов вылова клюворылого окуня в многомерном пространстве признаков проводили с применением алгоритма неметрического многомерного шкалирования (NMDS). Для определения наилучшей метрики расстояний в многомерном пространстве признаков использовали коэффициент корреляции Спирмена между исходной и моделируемой матрицами. Оценку меры расхождений между матрицами осуществляли при помощи показателя “Стресс” [16]. На ординационной диаграмме, полученной методом NMDS, по эмпирическим показателям биохимического анализа липидов (ТАГ, ЭХС и воска) были рассчитаны обобщенные аддитивные модели (GAM) с отрисовкой сплайн-регрессий в виде изолиний [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что накопление запасных липидов в скелетных мышцах [5] и печени [18] является не только стратегией депонирования энергетически ценных веществ в организме, но также и механизмом поддержания плавучести в толще воды с целью минимизации расхода энергии. В нашем исследовании было установлено, что совокупное содержание запасных классов липидов у окуня-клювача составляет 65% (или 4.74% сухого вещества) от общего количества липидов в мышцах (7.31% сухого вещества), а в печени — 57% (или 24.97% сухого вещества) от содержания ОЛ (43.81% сухого вещества).

Отмечено, что в мышцах клюворылого окуня количество ТАГ варьирует в пределах от 0.04 до 4.89% сухого вещества, а в печени в более широком диапазоне от 0.73 до 35.96% сухого вещества. Перестановочный многомерный дисперсионный анализ с использованием матриц расстояний показал достоверные различия в накоплении ТАГ в мышцах между отдельными горизонтами вылова ($p\text{-value} \leq 0.001$) окуня-клювача, однако не было установлено различий между самцами и самками ($p\text{-value} = 0.139$). В печени же, наоборот, были отмечены достоверные различия ($p\text{-value} \leq 0.001$) между самцами и самками по содержанию ТАГ (соответственно 18.99 и 13.77% сухого вещества), но не установлено отличий между горизонтами вылова ($p\text{-value} = 0.110$). Использование корреляционного анализа позволило определить “слабое”, однако значимое, снижение содержания ТАГ в мышцах окуня при увеличении глубины обитания ($r = -0.25$; $p\text{-value} = 0.001$), тогда как в печени данные изменения были недостоверными как у самцов ($r = 0.22$; $p\text{-value} > 0.05$), так и у самок ($r = 0.05$; $p\text{-value} > 0.05$). В то же время построение на основе биохимических данных обобщенных аддитивных моделей (GAM) между накоплением ТАГ в мышцах и печени и глубиной вылова окуня-клювача позволило установить разнонаправленную тенденцию содержания ТАГ в мышцах и в печени при увеличении глубины обитания (рис. 2). Согласно модели накопление ТАГ в мышцах рыб выше в горизонте глубин 320–400 метров, чем на глубинах 550–850 метров, тогда как в печени, наоборот, несколько выше на больших глубинах — 550–850 метров. Установленное (согласно GAM) увеличение содержания ТАГ в печени рыб с глубиной является результатом линейной зависимости глубины и содержанием ТАГ в печени (в рамках анализа — это гладкая полиномиальная функция переменной), тогда как корреляционная зависимость отражает исключительно линейную зависимость. Тем самым обобщенная аддитивная модель (в пределах доступных биохимических данных выборки) может указывать на более корректный экологический оптимум содержания ТАГ в печени, а также в мышцах, на разных глубинных горизонтах.

Липидные молекулы ТАГ являются “выгодной” формой запасаения энергии у рыб ввиду их быстрой мобилизации из клеток и высвобождения большого количества энергии — 39 кДж на 1 г липида. Снижение количества ТАГ в мышцах исследуемых рыб с глубиной и поддержание относительно постоянного их уровня в печени в градиенте глубин указывает на основную роль данного липида в качестве энергетического источника. В то же время относительно низкая плотность ТАГ (0.93 г/мл) в сравнении с морской водой (1.024–1.026 г/мл), а также физико-химические свойства данных молекул (сжимаемость, температура плавления и температурное

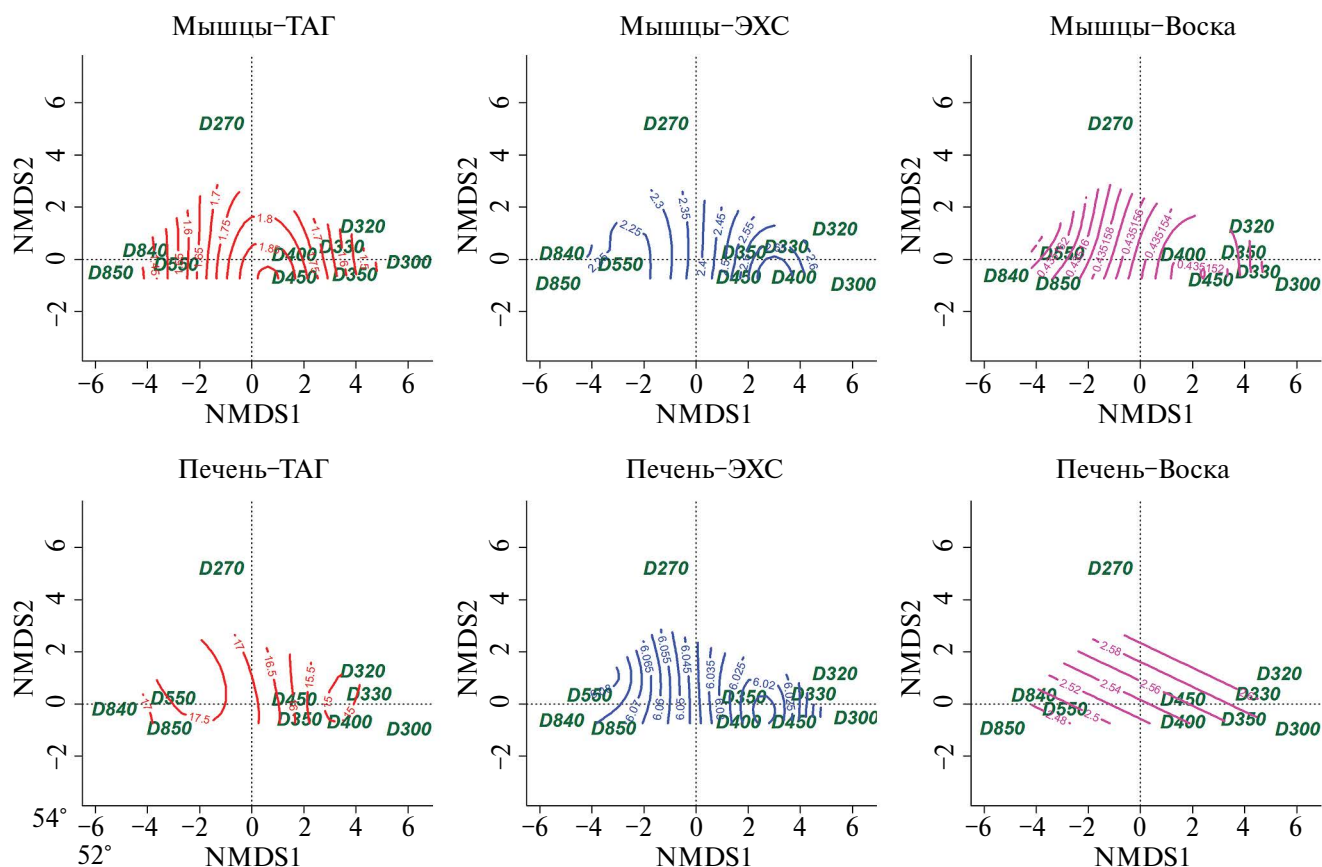


Рис. 2. Ординация глубин вылова окуня-клювача (*Sebastes mentella*) методом неметрического многомерного шкалирования с наложением модели сглаженных изолиний сплайн-регрессий, построенных по эмпирическим значениям количественного содержания запасных липидов (триацилглицеринов, эфиров холестерина и восков) в мышцах и печени. Примечание: цифрами, выделенными “зеленым” цветом, указаны глубины лова окуня-клювача.

расширение) могут способствовать положительной или нейтральной плавучести тела рыбы на определенных глубинах [7]. Известно, что высокая сжимаемость липидов делает любое положение нейтральной плавучести нестабильным на глубине — разница в плотности между липидом и окружающей морской водой (на глубине) чувствительна к химическому состоянию вещества [19]. Из этого следует, что молекулы ТАГ, при своих физико-химических параметрах, могут обладать положительными свойствами плавучести лишь в определенном диапазоне глубин, тогда как после достижения равновесия плотностей (нейтральной плавучести) — свойствами отрицательной плавучести. Таким образом, установленные в нашем исследовании изменения количества ТАГ в мышцах и печени в градиенте глубин могут быть также связаны с изменением плавучести клюворылого окуня на разных глубинах. Кроме того, возможно, что накопление ТАГ в печени дополнительно может оказывать компенсаторное влияние (а именно

сохранение) на плавучесть организма на горизонтах 550–850 метров, где наблюдается активный катаболизм данных молекул для энергетических нужд в мышцах, и, как следствие, изменение плавучести.

Количественное содержание других основных запасных классов липидов — ЭХС и восков — в мышцах окуня-клювача установлено в пределах соответственно 0.07–8.75 и 0.02–5.39% сухого вещества, тогда как в печени соответственно 0.07–13.35 и 0.59–7.64% сухого вещества. Отмечено, что содержание восков достоверно не различается между данными органами, тогда как количество ЭХС, наоборот, различается. Однако были выявлены отличия в накоплении ЭХС и восков в мышцах окуня на отдельных горизонтах вылова ($p\text{-value} \leq 0.001$). Согласно корреляционному анализу установлено разнонаправленное изменение содержания ЭХС и восков в мышцах при увеличении глубины обитания окуня-клювача — “слабое” (по шкале Чеддока) снижение ЭХС ($r = -0.20$; $p\text{-value} \leq 0.05$) и увеличение количества восков ($r = 0.17$; $p\text{-value}$

≤ 0.05). В печени же установлены исключительно половые различия по накоплению ЭХС и восков ($p\text{-value} \leq 0.001$). Статистический анализ сходства (ANOSIM) позволил выявить достоверные гендерные различия с некоторым перекрытием ($R = 0.27$; $p\text{-value} = 0.001$), сформированные, главным образом, более высоким содержанием ЭХС в печени самцов, по сравнению с самками — соответственно 7.50 и 4.99% сухого вещества. Количество же восков в печени самцов и самок также достоверно различалось ($p\text{-value} < 0.001$) и составило соответственно 3.25 и 2.19% сухого вещества.

Воска — низкоплотные (0.86 г/мл) и “медленно метаболизирующиеся” энергоёмкие липиды, которые в основном аккумулируются во внеклеточном пространстве, вследствие чего являются недоступными для внутриклеточных специфических липаз [6]. Тем самым сохраняется относительно постоянное количество восков в тканях и органах, что подтверждается довольно слабыми (хоть и достоверными) изменениями их количества у окуня в градиенте глубин, а также крайне слабыми изменениями количества восков в мышцах при изменении глубины на GAM модели (рис. 2). Ранее ряд исследователей [5, 19] указывали на прямую связь между содержанием восков и глубиной обитания морских гидробионтов, а также на участие данного липида в регуляции плавучести тела. Ввиду более высокой разницы плотностей между восками и морской водой, по сравнению с ТАГ, накопление восков может придавать организму окуня сравнительно высокие скорости всплытия, снижая тем самым энергетические затраты на двигательную активность и газорегуляцию плавательного пузыря в период восходящих перемещений. Установленное слабое, однако достоверное снижение содержания восков в мышцах клеворылого окуня при уменьшении глубины обитания может указывать также и на использование данного липида в качестве энергетического источника при всплытии окуня [20]. Кроме того, отмеченные достоверные различия между самцами и самками и выявленные различия по содержанию восков в печени между горизонтами 300–450 и 550–850 метров на GAM модели (рис. 2) могут указывать на отличия в скорости метаболизма между самцами и самками на разных глубинах.

Совокупное с восками накопление мультифункциональных ЭХС, главным образом, также связано с депонированием энергии и интенсивностью обмена веществ в организме окуня-клювача. Ввиду различий в локализации между данными липидами ЭХС являются доступными для внутриклеточных липаз и могут быть быстро преобразованы в другие биохимические вещества. При этом, в отличие от восков, процесс гидролиза ЭХС до молекулярного ХС сопровождается изменением плотности липида с 0.95 г/мл до 1.065 г/мл, что может являться

одним из дополнительных механизмов регуляции плавучести организма при вертикальных миграциях. Тем самым установленное снижение содержания ЭХС в мышцах с глубиной может быть связано с достижением необходимой плавучести клеворылого окуня, что подтверждается аддитивной моделью в мышцах (рис. 2).

Установленные различия между окунями из исследуемых районов вылова по содержанию ТАГ в мышцах (подрайон “А” — 1.64, “В” — 1.75, “С” — 2.18% сухого вещества; $p\text{-value} \leq 0.01$) и печени (подрайон “А” — 17.02, “В” — 13.86, “С” — 15.11% сухого вещества; $p\text{-value} \leq 0.05$), а также по накоплению ЭХС в мышцах (подрайон “А” — 2.52, “В” — 2.89, “С” — 2.46% сухого вещества; $p\text{-value} \leq 0.05$), вероятно, связаны с отличиями в абиотических условиях, таких как температура (средняя T горизонтов вылова окуня в подрайоне “А” — 4.42°C, “В” — 3.72°C, “С” — 3.48°C), а также с обилием, доступностью и качественным составом кормовой базы (степень наполненности желудка окуня-клювача в подрайоне “А” — 4, “В” — 3.5, “С” — 2.9), от которой прямо зависит качественный и количественный состав энергетически ценных липидов. Однако использование модели нелинейной регрессии (GAM) при определении различий между окунем-клювачем из трех регионов вылова и количественным содержанием запасных липидов в мышцах и печени рыб не выявило значимых изменений в количестве ТАГ, ЭХС и восков в особях из разных районов (рис. 3). Исключение составило накопление ТАГ в печени, которое было ниже в подрайоне “В”, что вероятно связано с особенностями метаболизма исследуемых окуней, отловленных в юго-восточной части района исследований (подрайон “В” — рис. 1).

Таким образом, запасные классы липидов низкой плотности, депонирующиеся в мышцах и печени окуня-клювача, кроме ведущей энергетической (резервной) функции могут также принимать участие в поддержании и регуляции плавучести рыбы при вертикальных перемещениях. Ввиду различий в физико-химических свойствах молекул, а также их чувствительности к гидростатическому давлению, качественный и количественный состав запасных липидов, а также их соотношений, могут являться одним из дополнительных механизмов регуляции и достижения оптимальной плавучести в ходе вертикальных миграций, работающих в комплексе с основными физиолого-анатомическими и поведенческими механизмами. При этом данные механизмы практически не различаются у особей окуня-клювача, отловленных в разных районах Северной Атлантики (море Ирмингера и сопредельные воды), а допустимые различия могут быть связаны со спецификой абиотических и биотических условий среды исследованного района. В то же время данные механизмы различаются между

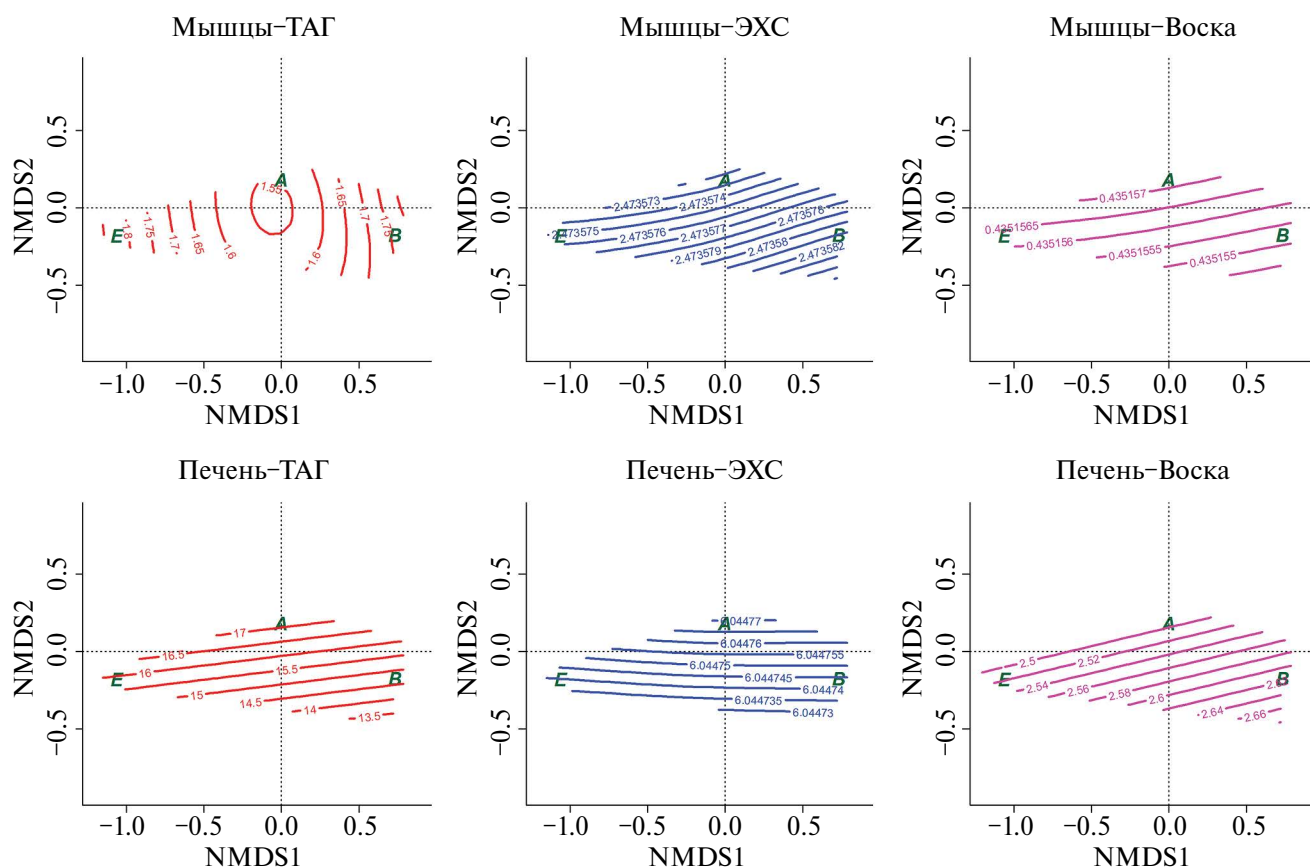


Рис. 3. Ординация подрайонов вылова окуня-клювача (*Sebastes mentella*) методом неметрического многомерного шкалирования с наложением модели сглаженных изолиний сплайн-регрессий, построенных по эмпирическим значениям количественного содержания запасных липидов (триацилглицерина, эфиров холестерина и восков) в мышцах и печени. Примечание: расшифровка подрайонов вылова представлена на рис. 1.

самцами и самками окуня-клювача, что, вероятно, связано с половыми отличиями в интенсивности метаболизма. Результаты исследования дополняют немногочисленные исследования по изучению биохимических механизмов миграций коммерчески ценного промыслового вида морских окуней Северной Атлантики – окуня-клювача, а также других гидробионтов со схожей двигательной активностью. Практическая значимость полученных результатов состоит в их применимости для оценки состояния и функционирования как экосистемы северных морей в целом, так и отдельных ее видов, что существенно для промысловой ихтиологии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубочайшую благодарность экипажу НИС “Атлантида” за помощь в ходе выполнения экспедиционных работ и исследований.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа проведена в рамках государственного задания КарНЦ РАН FMEN-2022-0006.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены (заседание этического комитета ИБ КарНЦ РАН №10 от 15.08.2024 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мантейфель Б.П. Вертикальные миграции морских организмов. Об адаптивном значении вертикальных миграций рыб планктофагов // Труды Института экологии и эволюции животных АН СССР. — 1961. — Т. 39. — С. 5–46.
2. Михеев В.Н. Неоднородность среды и трофические отношения у рыб. М.: Наука, 2006. — 191 с.
3. Hochachka P.W., Somero G.N. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. N.Y.: Oxford University Press, 2002. — 466 p.
4. Сиделева В.Г., Козлова Т.А. Сравнительное изучение эндемичных коттоидных рыб (Cottidae, Comperhoridae) в связи с их приспособлением к обитанию в пелагиали озера Байкал // Труды Зоологического Института РАН. — 2010. — Т. 314, № 4. — С. 433–447.
5. Lee R.F., Nevenzel J.C., Paffenhofer G.-A. Importance of wax esters and other lipids in the marine food chain: Phytoplankton and copepods // Marine Biology. — 1971. — Vol. 9, N. 2. — P. 99–108.
6. Phleger C.F. Biochemical aspects of buoyancy in fishes. Amsterdam: Elsevier, 1991. — P. 209–247.
7. Phleger C.F. Buoyancy in marine fishes: Direct and indirect role of lipids // American Zoologist. — 1998. — Vol. 38, N. 2. — P. 321–330.
8. Мельников С.П. Океанический окунь-клювач Северной Атлантики: биология и промысел. Мурманск: Издательство ПИНРО, 2006. — 111 с.
9. Planque B., Kristinsson K., Astakhov A., et al. Monitoring beaked redfish (*Sebastes mentella*) in the North Atlantic, current challenges and future prospects // Aquatic Living Resources. — 2013. — Vol. 26, N. 4. — P. 293–306.
10. Voronin V.P., Nemova N.N., Ruokolainen T.R., et al. Into the deep: New data on the lipid and fatty acid profile of redfish *Sebastes mentella* inhabiting different depths in the Irminger sea // Biomolecules. — 2021. — Vol. 11, N. 5. — Article ID. 704.
11. Gauthier S. Target Strength of encaged Atlantic redfish (*Sebastes* spp.) // ICES Journal of Marine Science. — 2001. — Vol. 58, N. 3. — P. 562–568.
12. Gauthier S., Rose G.A. An hypothesis on endogenous hydrostasis in Atlantic redfish (*Sebastes* spp.) // Fisheries Research. — 2002. — Vol. 58, N. 2. — P. 227–230.
13. Working group on international deep pelagic ecosystem surveys (WGIDEEPS) // ICES Scientific Reports. — 2021. — Vol. 3:43. — 32 p.
14. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // Journal of Biological Chemistry. — 1957. — Vol. 226, N. 5. — P. 497–509.
15. Olsen R.E., Henderson R.J. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. — 1989. — Vol. 129, N. 2. — P. 189–197.
16. Толстова Ю.Н. Основы многомерного шкалирования: учебное пособие. М.: КДУ, 2006. — 160 с.
17. Wood S.N. Low-Rank scale-invariant tensor product smooths for generalized additive mixed models // Biometrics. — 2006. — Vol. 62, N. 4. — P. 1025–1036.
18. Del Raye G., Jorgensen S.J., Krumhansl K., et al. Travelling light: white sharks (*Carcharodon carcharias*) rely on body lipid stores to power ocean-basin scale migration // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. — 2013. — Vol. 280, N. 1766. — Article ID. 20130836.
19. Campbell R., Dower J. Role of lipids in the maintenance of neutral buoyancy by zooplankton // Marine Ecology Progress Series. — 2003. — Vol. 263. — P. 93–99.
20. Sargent J.R., Gatten R.R., McIntosh R. Wax esters in the marine environment — their occurrence, formation, transformation and ultimate fates // Marine Chemistry. — 1977. — Vol. 5, N. 4–6. — P. 573–584.

THE ROLE OF STORAGE LIPIDS IN VERTICAL MIGRATIONS OF THE BEAKED REDFISH (*SEBASTES MENTELLA*) IN THE NORTH ATLANTIC

V. P. Voronin^{a, *}, A. Y. Rolskii^b, A. M. Orlov^{c, d}, S. A. Murzina¹

¹*Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
Petrozavodsk, Russian Federation*

^b*Polar Branch of the "Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (VNIRO)",
Murmansk, Russian Federation*

^c*Shirshov Institute of Oceanology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

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

**E-mail: voronen-viktor@mail.ru*

Presented by Academician of the RAS N.N. Nemova

The content of the main classes of storage lipids — triacylglycerols, cholesterol esters and waxes — in the muscles and liver of the beaked redfish (*Sebastes mentella*) and their changes in the depth gradient and in different areas of the North Atlantic were studied. Significant differences in the quantitative content of reserve lipids in beaked redfish's from different fishing horizons were established. The analyzed changes the lipids in tissues and organs of fishes with increasing depth indicate the use of triacylglycerols, cholesterol esters and waxes as energy sources, as well as for maintaining buoyancy of the organism during vertical migration. The results of the study can be used for further study of the migration biochemical mechanisms of the commercial sea bass species of the North Atlantic — the beaked redfish, as well as other aquatic organisms with similar swimming activity. Reliable differences in the quantitative content of reserve lipids in sea bass from different fishing horizons were established.

Keywords: lipids, beaked redfish, mesopelagic zone, ecological-biochemical adaptations, vertical migration, North Atlantic

УДК 612.13, 577.35

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА ОТ НОВОРОЖДЕННЫХ ДО ЗРЕЛОГО ВОЗРАСТА

© 2024 г. А. А. Гриневич, Н. К. Чемерис

Представлено академиком РАН В.Н. Шабалиным

Поступило 15.07.2024 г.

После доработки 15.08.2024 г.

Принято к публикации 17.08.2024 г.

Цель исследования состояла в выявлении закономерностей возрастной динамики частотно-зависимой регуляции вариабельности сердечного ритма (ВСР) на основе анализа Холтеровских регистраций ЭКГ здоровых испытуемых 4 возрастных групп: новорожденные, годовалые младенцы, подростки и взрослые. Показан широкий спектральный состав ВСР, который формируется 9 модами Гильберта-Хуанга в диапазоне частот от 0.0001 до 2 Гц. Показано снижение центральных частот всех мод в постнатальный период с выходом на плато в подростковом возрасте. Продemonстрировано быстрое развитие системной гуморальной регуляции ВСР, характеризующееся консолидированным увеличением амплитуд соответствующих мод с выходом на плато в подростковом возрасте. Показан куполообразный характер возрастных изменений амплитуды мод, связанных с вегетативным контролем, с максимумом в подростковом возрасте. Полученные результаты количественно демонстрируют возрастные консолидированные изменения параметров ВСР от новорожденных до зрелого возраста.

Ключевые слова: сердечно-сосудистая система, вариабельность сердечного ритма, возрастная динамика, метод Гильберта–Хуанга, вейвлет-анализ

DOI: 10.31857/S2686738924060107

Динамические механизмы формирования гомеостаза организма человека изучены недостаточно полно, для широкого использования этой концепции в практической медицине. Значительный вклад в ее развитие был внесен академиком П.К. Анохиным, который сформулировал положение о том, что живой организм формируется на основе самоорганизующихся и саморегулирующихся многокомпонентных функциональных систем, совместная работа которых направлена для достижения полезных для организма приспособительных механизмов [1]. В дальнейшем она была развита в работах академика К.В. Судакова на основе принципов саморегуляции функциональных систем организма, а также построения целого организма на основе мульти-параметрического взаимодействия всех его функциональных систем [2, 3].

Дальнейшее ее развитие предложено профессором Р.С. Ivanov который постулирует, что человеческий организм представляет собой интегрированную сеть, в которой сложные физиологические системы постоянно взаимодействуют друг с другом для оптимизации и координации своих функций. Взаимодействия между органами происходят на многих уровнях и в разных пространственно-временных масштабах, создавая различные физиологические состояния. Топология сети физиологических взаимодействий, а также связность всех систем организма приводят к глобально интегрированному поведению, которое формируется отдельными состояниями и функциями [4, 5].

Считается, что множество взаимодействующих элементарных процессов, одновременно участвующих в формировании разномасштабных динамических состояний тканей, органов и целого организма, может приводить к поличастотным колебаниям изучаемых параметров конкретного процесса [6]. Основными характеристиками колебательного процесса (сигнала) являются амплитуда и частота. Амплитуда сигнала определяет его энергию. Энергия позволяет оценить возможную работу, которую способен совершить анализируемый сигнал. Кроме

*Институт биофизики клетки Российской академии наук обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Федеральный исследовательский центр “Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук””, Пущино, Россия
e-mail: grin_aa@mail.ru, nikolai.chemeris@mail.ru*

того, амплитуда и частота сигнала, как по отдельности, так и в комплексе, содержат информацию о процессах его породивших. Представления о роли информационных сигналов в функционировании биологических систем начали развиваться еще в России и в настоящее время входят в широкую международную практику [3]. Основная идея состоит в том, что эффективность действия информационных сигналов в первую очередь зависит от их “важности и своевременности” для биологической системы, а их энергия может минимально превышать пороги срабатывания отдельных ее составляющих в составе целостной живой системы.

Так, применительно к процессу variability сердечного ритма (ВСР) его поличастотный характер обусловлен влиянием эндо- и экзогенных процессов с периодичностью от секунд, определяемых взаимодействием с другими системами, а также физическими и психоэмоциональными нагрузками, до нескольких десятков лет, определяемых возрастными изменениями. Считается, что основной вклад в энергию колебаний ВСР вносят колебания высокочастотной (0.15–0.4 Гц) и низкочастотной (0.04–0.15 Гц) части спектра, которые в основном формируются парасимпатической и симпатической системой, что послужило причиной сниженного внимания к анализу колебаний ВСР в очень низкочастотном (0.003–0.04 Гц) и ультранизкочастотном (0.0001–0.003 Гц) интервалах [7]. Ранее было показано резкое частотно зависимое снижение при уменьшении частоты вклада энергии спектральных компонент ВСР, полученных с помощью преобразования Гильберта-Хуанга (Г-Х), в общую энергию спектра [8].

Методы анализа динамики ВСР проработаны и хорошо известны. На сегодняшний момент хорошо изучена роль симпато-вагального баланса в регуляции частоты сердечных сокращений (ЧСС) или в формировании ВСР на коротких сигналах длительностью от 5 до 10 минут. На более длительных интервалах регистрации кардиоритма от десятков минут до суток и более механизмы формирования ВСР изучены менее детально, так как в основном были сосредоточены на исследовании динамики высокочастотных колебаний ВСР, которая формируется вагусной нервной регуляцией. В последние годы на основе запатентованного изобретения на “Способ количественной оценки суточной variability сердечного ритма” предложен и обоснован новый подход к оценке ВСР на длительных промежутках времени [9, 10]. При этом на большой статистической выборке выявлена связь изменений интегральных параметров суточной ВСР с изменениями функционального и гемодинамического состояния кровеносной системы больных легочной гипертензией, что может быть использовано для оценки динамики функционального состояния сердечно-сосудистой системы (ССС) пациента на фоне

проводимого лечения. Однако амплитудно-частотные спектры медленных, сверхмедленных и ультрамедленных колебаний ВСР изучены недостаточно полно, что во многом связано с некорректностью применения гармонических методов анализа к нестационарным и нелинейным временным рядам ВСР. Эти недостатки не присущи методу спектрального анализа на основе преобразования Г-Х, которое позволяет разложить ряд ВСР на эмпирические моды с последующим представлением спектральных характеристик полученных мод на основе вейвлет преобразования (ГХВ) [8,11]. Ранее нами было показано, что в результате ГХВ-анализа короткие 7-минутные ряды ВСР могут быть разложены на четыре эмпирические моды [8]. Эти результаты позволили предположить, что разработанные алгоритмы могут быть использованы для анализа длительных рядов ВСР, что позволит выявить новые закономерности участия системной регуляции, определяемой широким диапазоном частот, в процессах нормальных функциональных возрастных изменений от рождения до зрелого возраста.

Целью исследования было выявление возрастной динамики частотно-зависимой регуляции ВСР в широком диапазоне частот на длительных Холтеровских регистрациях электрокардиограммы (ЭКГ) здоровых испытуемых четырех возрастных групп: новорожденные, годовалые младенцы, подростки и взрослые, в условиях их повседневной жизнедеятельности.

В работе были использованы записи суточного Холтеровского мониторинга ЭКГ, взятые из международной базы данных (RR interval time series from healthy subjects, version 1.0.0) [12, 13]. В исследование были включены участники без клинических симптомов заболевания, которые не принимали лекарств и чьи ЭКГ соответствовали возрастным нормам. Холтеровское мониторирование регистрировалось в течение 24 ч цифровыми трехканальными регистраторами DMS300 7 и DMS300 3A. Регистраторы DMS имели частоту дискретизации 1024 Гц на канал. Сигналы анализировались с помощью программного обеспечения Galix и программного обеспечения CardioScan 10.0, 11.0 для регистраторов DMS. Сердечные RR интервалы в записях были автоматически обнаружены и классифицированы программным обеспечением Holter, а затем проверены и скорректированы двумя специалистами кардиологами. Все записи были проанализированы такт за тактом, чтобы идентифицировать и скорректировать как можно больше R-пиков. Временные ряды ВСР с артефактами более 8% не были включены в исследование, как и те, у которых артефакты длились более 20 секунд. Было проанализировано 43 временных ряда ВСР здоровых испытуемых четырех возрастных групп – новорожденные (1–2 месяца, $n = 10$, g1), годовалые младенцы (1–2 года, $n = 10$, g2),

подростки (11–17 лет, $n = 14$, g3) и взрослые (24–55 лет, $n = 9$, g4). Длительность индивидуальных записей варьировалась от 9 до 24 часов.

Спектральный анализ временных рядов ВСР проводили с использованием ранее разработанного ГХВ-анализа, позволяющего получить спектральные кривые эмпирических мод ВСР [8]. Сравнительный анализ спектральных кривых мод проводился на основе оценки их максимальных амплитуд колебаний и соответствующих им частот. Для этого для каждой моды каждого испытуемого в группе находился максимум спектральной кривой и соответствующая ему частота.

Для статистического анализа использовали непараметрические методы в силу малого размера выборок (от 9 до 14) и не выполнение теста Шапиро–Уилка для анализируемых параметров. Таким образом, полученные максимальные амплитуды и соответствующие им частоты для заданной моды сравнивались попарно между всеми возрастными группами с помощью непараметрического метода Манна–Уитни.

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 ОБСУЖДЕНИЕ

ГХВ-анализ показал, что все сигналы ВСР можно разложить на девять эмпирических мод. Их амплитудно-частотные спектральные кривые в полулогарифмических координатах имели колоколообразную форму и перекрывались между собой на оси частот (рис. 1). Такая форма спектральных кривых мод наблюдалась для всех исследованных возрастных групп. Длинные Холтеровские записи кардиоинтервалов позволили оценить спектры мод в очень широких частотных интервалах от 1.1×10^{-4} – 2.0 Гц для новорожденных до 1.1×10^{-4} – 0.4 Гц для взрослых.

Результат оценки возрастных изменений максимумов спектральных кривых мод и соответствующих им частот представлены на рис. 2. Сравнение мод одинаковых номеров показало, что максимальные амплитуды первых четырех мод у новорожденных (g1) самые низкие, по сравнению с другими группами, однако достоверные отличия наблюдались для мод 1, 2 и 4. Частоты максимумов всех мод у новорожденных были достоверно (кроме 9-й моды) сдвинуты в более высокочастотную область по сравнению с другими группами. Сдвиг частот может быть обусловлен как высокой ЧСС, так и постнатальным периодом развития системной регуляции и, в частности, вегетативной

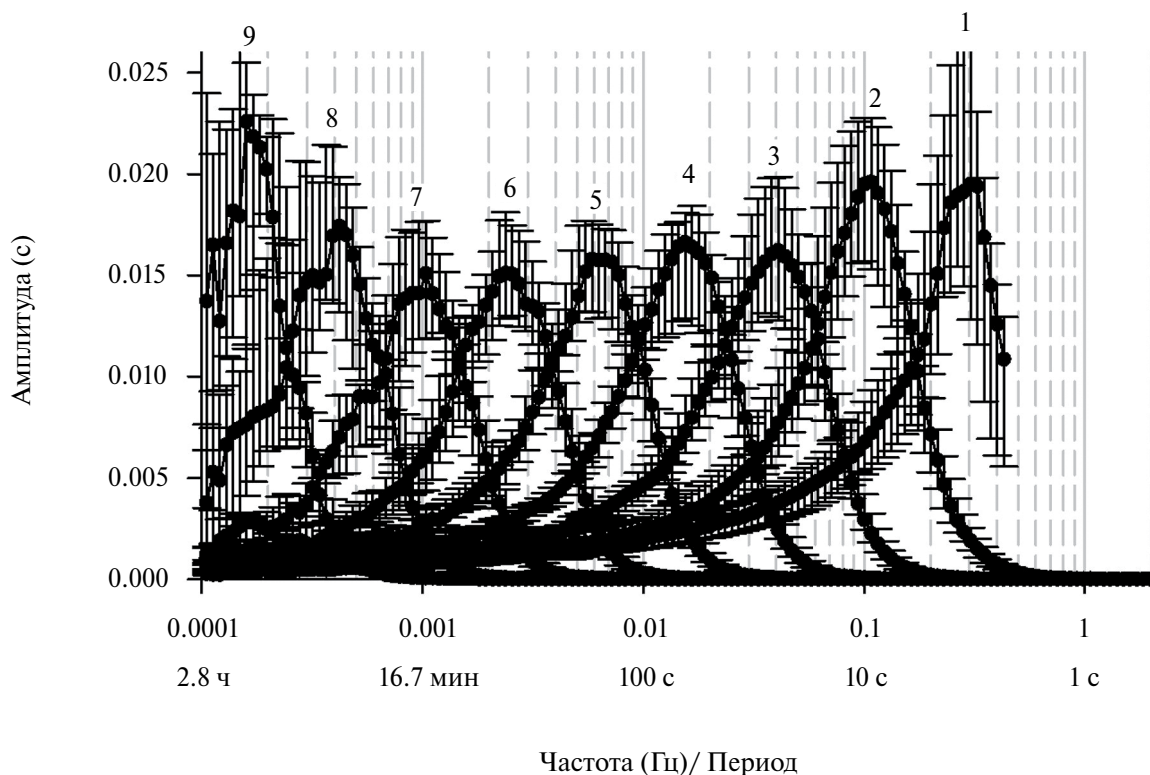


Рис. 1. Спектральные кривые эмпирических мод ВСР подростков (11–17 лет, g3). Данные представлены как медиана и 25 и 75 перцентили. Числа на графиках – номера мод.

нервной системы, которая активно развивается до 2 лет [14]. Системная же регуляция продолжает развиваться вплоть до позднего подросткового возраста [15]. Максимальные амплитуды самых низкочастотных мод 8 и 9 в 1.5–2 раза превышают соответствующие значения более высокочастотных мод 3–7, причем для 9-й моды это достоверные различия в группах. Эти наблюдения позволяют разбить полученные моды для всех исследуемых возрастных групп на три группы мод и соотнести их с известными представлениями о механизмах регуляции ВСР [7, 16]: 1-я группа – это моды 1 и 2, соответствующие вегетативному контролю ВСР, 2-я группа – это моды 3–7, соответствующие нейрогуморальному контролю ВСР (терморегуляция, периферический вазомоторный тонус, ренин-ангиотензиновая система), 3-я группа – это моды 8, 9, которые могут отражать как гуморальный контроль ВСР, так и колебательные режимы более сложно организованных системных процессов поддержания жизнедеятельности организма. Следует отметить, что полученные данные указывают на несоответствие мод из первой группы (1–2) современным представлениям о частотных характеристиках вегетативной регуляции ВСР новорожденных: симпатическая регуляция (0.04–0.15 Гц) и парасимпатическая

регуляция или дыхательный ритм (0.15–2 Гц) [16]. Это говорит о необходимости уточнения границ соответствующих частотных интервалов.

С увеличением возраста наблюдается сдвиг частот максимумов спектральных кривых мод в более низкочастотную область с выходом на плато для подростков и зрелого возраста. Достоверные различия для новорожденных и годовалых младенцев в сравнении между собой и с другими группами наблюдаются практически для всех мод. Напротив, достоверных различий в частотном сдвиге между подростками и зрелым возрастом практически нет. Аналогичные наблюдения демонстрируются и другими методами анализа ВСР у детей [15].

Изменение максимальной амплитуды внутримодовых колебаний с возрастом имеет более сложный характер. В первые два года значительно увеличиваются моды первой группы, а моды 2 и 3 группы либо не изменяются, либо их изменение не значительно. Считается, что в этот период происходит активное постнатальное развитие вегетативной регуляции [16].

Дальнейшие возрастные изменения носят более глобальный системный характер. На это указывают двукратное увеличение максимальных амплитуд всех мод у подростков (g3) по сравнению с годовалыми

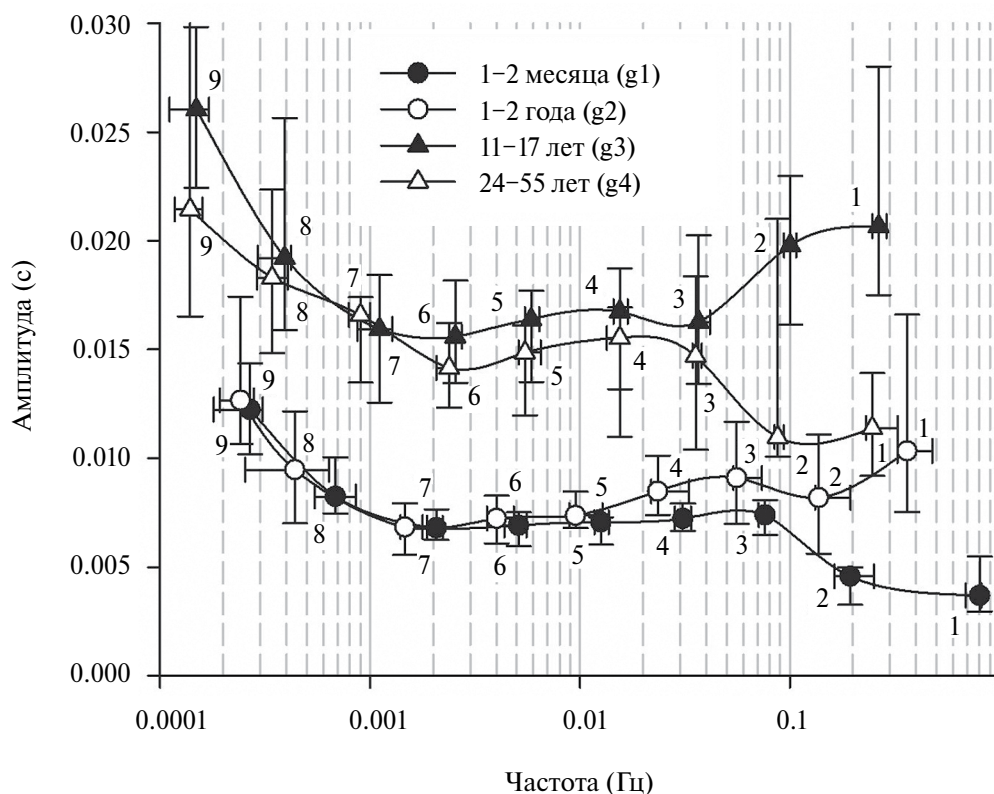


Рис. 2. Максимумы и соответствующие им частоты для спектральных кривых эмпирических мод ВСР для разных возрастных групп. Данные представлены как медиана и 25 и 75 перцентили. Числа на графике – номера мод.

младенцами (g2). При этом преобладающий характер по скорости развития сохраняется у вегетативной системы (1-я группа мод), где на первое место выходит парасимпатическая регуляция, о чем свидетельствуют и другие исследования [15]. Важно отметить, что в этот период осуществляется развитие, настройка и активное участие гуморальных процессов в регуляции ВСР, определяющих ультранизкочастотные и очень низкочастотные колебания, принадлежащих 3-й и 2-й группам. Интересно, что увеличение амплитуд этих колебаний, как и амплитуд 1-й группы, происходит в одно и то же количество раз, что указывает на определенную самосогласованность развития и настройки системной регуляции отдельных тканей, органов и систем органов, определяющей оптимальное функционирование целого организма в условиях меняющейся внешней среды.

И наконец, на этапе перехода от подросткового возраста (g3) к зрелому (g4) наблюдается отсутствие достоверных изменений амплитуд мод 2-й и 3-й группы, но двукратное снижение амплитуды колебаний в модах 1-й группы. Это говорит о том, что окончательно настроенная системная гуморальная регуляция проявляет высокую стабильность при переходе к зрелому возрасту, в то время как вегетативный контроль более лабильный и продолжает значительно меняться с возрастом, снижая свою активность. На небольшое снижение активности вегетативного контроля при переходе от позднего детства 15–16 лет к юношеству 20 лет указывают и другие исследователи [15]. Еще один момент, который следует отметить, это то, что с возрастом сохраняется форма, описываемая относительным положением максимумов спектральных компонент мод 2-й и 3-й группы, что может быть результатом наличия связей между процессами, регулируемыми ВСР.

Таким образом, с помощью метода ГХВ был проведен спектральный анализ ВСР испытуемых 4 возрастных групп в условиях их повседневной жизнедеятельности в широком диапазоне частот на длительных Холтеровских регистрациях ЭКГ, который позволил оценить амплитудно-частотные характеристики системной регуляции ВСР и их возрастные изменения. В отличие от традиционных методов Фурье- и вейвлет-анализа, показан более детальный спектральный состав ВСР в общепринятых частотных интервалах: ультранизкочастотный, очень низкочастотный, низкочастотный и высокочастотный. Было выявлено девять эмпирических мод. Показано достоверное снижение частот максимумов спектральных кривых всех мод в постнатальный период с выходом на плато в подростковом возрасте. Выявлено несоответствие границ низкочастотного и высокочастотного интервалов расположению максимумов первых двух мод у новорожденных, что говорит о необходимости уточнения значений границ этих интервалов для этого возраста. Продемонстрировано быстрое развитие системной гуморальной

регуляции ВСР, связанное с консолидированным увеличением амплитуд мод 2-й и 3-й группы с выходом на плато в подростковом возрасте. Консолидированные изменения указывают на наличие сильной взаимосвязанности регуляторных процессов. Показан более сложный куполообразный характер изменения мод 1-й группы (вегетативный контроль) с максимумом в подростковом возрасте.

Новые результаты, полученные на основе спектрального метода Гильберта–Хуанга с последующей их визуализацией с использованием вейвлет преобразования могут стать основой базовой технологии широкополосного анализа вариабельности сердечного ритма для ряда прикладных программ, предназначенных для интегральной оценки функционального состояния регуляции сердечно-сосудистой системы в норме и при различных патологиях. Базовая технология может быть инкорпорирована в уже существующие программные средства контроля ритма сердца на временных масштабах от нескольких минут до нескольких суток, что может существенно расширить их диагностические возможности в оценке как функционального состояния регуляторных систем сердечно-сосудистой системы, так и всего организма в целом. Это открывает новые возможности как в области фундаментальных исследований в кардиофизиологии, так и в практической кардиологии.

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

По данным используемой базы данных RR interval time series from healthy subjects (version 1.0.0) [12] все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской 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. Анохин П.К. Принципиальные вопросы общей теории функциональных систем. В кн.: Принципы системной организации функций. М. Наука; 1973. С. 5-61.
2. Судаков К.В. Общие закономерности динамической организации функциональных систем // Человек и его здоровье. 2005. №2. С. 4-13.
3. Судаков К.В. Информация в деятельности функциональных систем организма // Вестник ЧелГУ. 2009. №11. С. 35-46.
4. Ivanov P.C., Liu K.K.L., Bartsch R.P. Focus on the emerging new fields of Network Physiology and Network Medicine // New J Phys. 2016. Vol. 18. P. 100201.
5. Ivanov P.C. The New Field of Network Physiology: Building the Human Physiome // Front Netw Physiol. 2021. Vol. 1. P. 711778.
6. Stefanovska A., McClintock P.V.E, editors. Physics of Biological Oscillators. Cham: Springer; 2021.
7. Task Force of the European Society of Cardiology, and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability standards of measurement, physiological interpretation and clinical use // Eur. Heart J. 1996. Vol. 17. P. 354–381.
8. Гриневич 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.
9. Соболев А.В., Рябыкина Г.В., Кожемякина Е.Ш. Новый метод анализа variability синусового ритма на длительных промежутках времени, учитывающий наличие на ритмограмме двойных изломов // Медицинский алфавит. 2017. Т. 1, № 14. С. 22-27.
10. Курбонбекова А.В. Соболев Е.Ш. Кожемякина Т.М. и др. Анализ динамики суточной variability синусового ритма по данным Холтеровского мониторинга для оценки эффективности лечения больных легочной гипертензией // Медицинский алфавит. 2022. № 20. С. 29-35.
11. 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. Vol. 454. P. 903–95.
12. Irurzun I.M., Garavaglia L., Defeo M.M., et al. RR interval time series from healthy subjects (version 1.0.0) // PhysioNet. 2021.
13. 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. Vol. 101, № 23. P. e215–e220.
14. Chiera M., Cerritelli F., Casini A., et al. Heart Rate Variability in the Perinatal Period: A Critical and Conceptual Review // Front Neurosci. 2020. Vol. 14. P. 561186.
15. Hartevelde L.M., Nederend I. Harkel A.D.J., et al. Maturation of the Cardiac Autonomic Nervous System Activity in Children and Adolescents // J Am Heart Assoc. 2021. Vol. 10. P. e017405.
16. Patural H., Franco P., Pichot V., et al. Heart Rate Variability Analysis to Evaluate Autonomic Nervous System Maturation in Neonates: An Expert Opinion // Front Pediatr. 2022. Vol. 10. P. 860145.

AGE-RELATED CHANGES IN HEART RATE VARIABILITY FROM THE NEONATAL PERIOD TO ADULTHOOD

A. A. Grinevich, N. K. Chemeris

*Institute of Cell Biophysics of Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation**E-mail: grin_aa@mail.ru, nikolai.chemeris@mail.ru*

Presented by Academician of the RAS V.N. Shabalin

The aim of the study was to reveal the regularities of the age-related dynamics of the frequency-dependent regulation of heart rate variability (HRV) based on the analysis of Holter ECG recordings from healthy subjects of 4 age groups: neonates, one-year-old infants, adolescents and adults. A wide spectral composition of HRV is shown, consisting of 9 Gilbert-Huang modes in the frequency range from 0.0001 to 2 Hz. A decrease in the central frequencies of all modes is shown in the postnatal period with a plateau in adolescence. A rapid progression of systemic humoral regulation of HRV, characterized by a consolidated increase in the amplitudes of the corresponding modes with a plateau in adolescence, is demonstrated. The dome-shaped character of age-related changes in amplitude of modes associated with autonomic control with a maximum in adolescence is shown. The results obtained quantitatively demonstrate age-related consolidated changes in HRV parameters from neonates to adulthood.

Keywords: cardiovascular system, heart rate variability, age-related dynamics, Hilbert-Huang method, wavelet analysis

УДК 571.27

БАКТЕРИИ *ESCHERICHIA COLI* И *MICROCOCOCCUS LUTEUS* АКТИВИРУЮТ ГЕН *CG45045* В ЛИНИИ КЛЕТОК S2 ДРОЗОФИЛЫ

© 2024 г. Ю. А. Полунина, А. Э. Праведникова, М. Гасса, академик РАН П. Г. Георгиев, Ю. В. Шидловский, З. М. Качаев*

Поступило 25.07.2024 г.

После доработки 15.08.2024 г.

Принято к публикации 17.08.2024 г.

Гуморальная иммунная система дрозофилы, наиболее изученная среди эукариот, активируется каноническими сигнальными путями IMD и Toll. Недавно выявлены новые потенциальные регуляторы врожденного иммунного ответа, такие как длинные некодирующие РНК (днРНК) и гены, кодирующие короткие полипептиды. Клетки S2, будучи макрофагоподобной клеточной линией, используются как модельная система для изучения молекулярных механизмов активации генов иммунного ответа. Мы использовали эту линию клеток для анализа влияния бактерий *Escherichia coli* и *Micrococcus luteus* на транскрипцию днРНК-*CR30055* и генов *CG45045* и *CG44404*, кодирующих короткие полипептиды. Обнаружено, что патогены активируют только *CG45045*, тогда как уровни транскрипции *CR30055* и *CG44404* остаются неизменными. Также не наблюдалось активации гена *Cecropin C* и некоторых генов семейства *Vomanin*, что указывает на различия в паттернах активации генов иммунного ответа в клетках S2 и взрослых мухах. При этом наиболее высокая активация *CG45045* наблюдалась между 6 и 12 часами инкубации клеток с патогенами. Паттерны активации *CG45045* после воздействия *E. coli* и *M. luteus* были схожими, что может указывать на общие механизмы активации транскрипции этого гена. Таким образом, *CG45045* может быть новым геном, вовлеченным в гуморальный иммунный ответ дрозофилы.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, полипептид, днРНК, IMD, Toll

DOI: 10.31857/S2686738924060116

Плодовая мушка, являясь удобным модельным объектом, внесла значительный вклад в понимание фундаментальных механизмов врожденного иммунитета. Активация гуморального иммунного ответа начинается с запуска двух сигнальных путей: IMD и Toll [1, 2]. Путь IMD активируется грамотрицательными (Грам(-)) бактериями, тогда как Toll – грамположительными (Грам(+)) бактериями и грибами. Каскад активации сигнальных путей IMD и Toll завершается привлечением специфических факторов транскрипции на промоторные области генов антимикробных пептидов (АМП). Ключевым фактором транскрипции для пути IMD является протеолитически расщепленный вариант белка Relish – Rel68, тогда как для пути Toll – это факторы Dif и Dorsal (рис. 1a). Привлечение этих факторов приводит к гиперактивации генов, кодирующих антимикробные пептиды. К наиболее

изученным генам АМП относятся *Metchnikowin (Mtk)*, *Drosocin (Dro)*, *Cecropins (Cec)* и т.д. [2, 3].

Помимо классических генов АМП, в настоящее время активно исследуется вклад потенциально новых регуляторов в активацию врожденного иммунитета у насекомых. Это позволяет не только глубже понять механизмы их активации, но и изучить возможные взаимодействия гуморального иммунного ответа с другими сигнальными путями. К таким новым регуляторам относятся гены, кодирующие короткие полипептиды и длинные некодирующие РНК (днРНК). Например, ген *CG44404*, активирующийся при заражении мух бактериями *Enterococcus faecalis* и *M. luteus*, кодирует пептид с антимикробной активностью [4]. Некоторые днРНК также участвуют в регуляции иммунитета: у млекопитающих они активируются в иммунных клетках [5], а у дрозофилы днРНК, например, такие как *CR46018*, *CR33942* и *CR11538* подавляют транскрипцию генов АМП, конкурируя с факторами транскрипции пути Toll [6].

Наш предварительный транскриптомный анализ выявил несколько новых потенциальных регуляторов иммунного ответа в клетках S2.

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

*e-mail: k-z-m@mail.ru

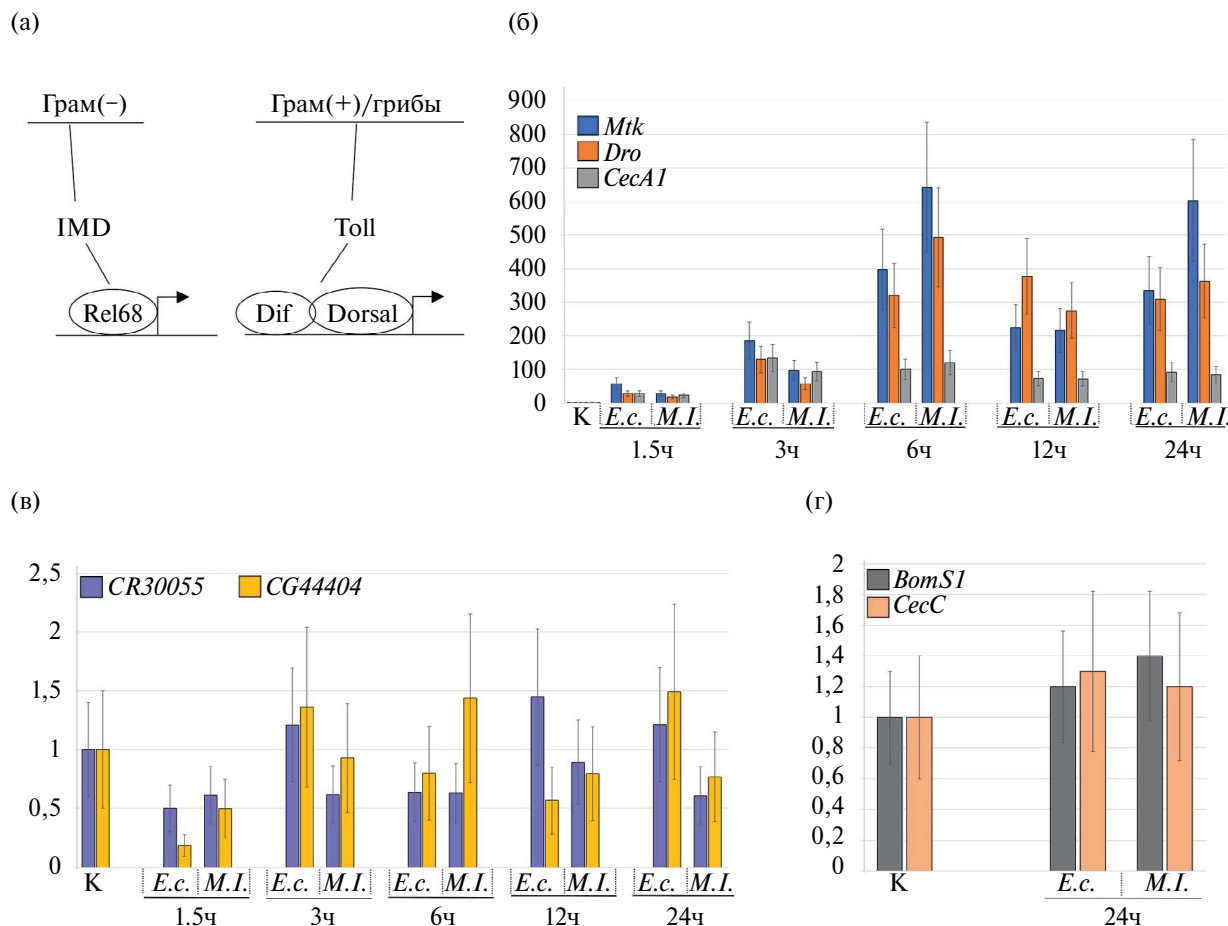


Рис. 1. Активация генов иммунного ответа в клетках S2. (а) Схема активации сигнальных путей IMD и Toll. (б), (в), (г) Анализ уровней экспрессии генов АМП, *днPHK-CR30055*, *CG44404*, *BomS1* и *CecC*. Уровни транскрипции анализировали в следующих точках: К – 0 часов (ч), 1.5 ч, 3 ч, 6 ч, 12 ч и 24 ч. S2 клетки были обработаны инактивированными культурами *E. coli* (*E.c.*) с оптической плотностью (OD) 0.03 и *M. luteus* (*M.I.*) с OD 1.2. Приведены средние значения и стандартные отклонения для трех независимых экспериментов. Активация рассчитана относительно К. Отличие является статистически значимым для генов АМП (б) во всех точках ($p < 0.05$), кроме 1.5.

В частности, уровни экспрессии *днPHK-CR30055* и гена *CG45045* повышались после ночной инкубации клеток S2 с бактериями *E. coli* и *M. luteus*. Для более детального анализа динамики экспрессии этих генов, а также положительного контроля *CG44404*, мы исследовали паттерны их активации в разные моменты времени методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Клетки инкубировали с *E. coli* и *M. luteus* в течение 1.5, 3, 6, 12 и 24 часов. Успешность активации иммунного ответа оценивали по уровню экспрессии соответствующих генов АМП. Мы обнаружили, что наиболее высокий уровень активации *Mtk*, *CecA1* и *Dro* наблюдается в интервале между 6 и 24 часами инкубации клеток S2 с патогенами (рис. 1б). Далее мы проанализировали влияние *E. coli* и *M. luteus* на активацию *CG45045*, *CG44404* и *CR30055*.

Мы не обнаружили какой-либо статистически значимой активации транскрипции *CR30055* и *CG44404* (рис. 1в). Стоит отметить, что ранее уже было показано несоответствие уровней транскрипции патоген-зависимых генов в культуре клеток и во взрослых мухах [7]. Зачастую высокий уровень транскрипции генов иммунного ответа наблюдался во взрослых мухах, но не в культуре клеток. Например, уровень транскрипции *Diptericin* (*Dpt*) значительно ниже в культуре клеток по сравнению со взрослыми мухами [7, 8]. Мы также обнаружили незначительное усиление транскрипции гена *Dpt* в клетках S2. Кроме того, уровень транскрипции *Cecropin C* (*CecC*) практически не менялся (рис. 1г). Наконец, мы проанализировали уровень транскрипции генов *BomS1* и *BomS3*, которые относятся к кластеру генов семейства *Bomanin*, участвующих

в пути Toll [9]. Нам удалось детектировать только продукт амплификации *BomS1*. Уровень транскрипции этого гена не менялся после обработки клеток S2 *E. coli* и *M. luteus* (рис. 1г). Таким образом, данные из литературы и полученные нами указывают на то, что экспрессия некоторых патоген-зависимых генов отличается в культуре клеток и во взрослых мухах. Есть несколько объяснений этому феномену.

Во-первых, это может быть связано с доминированием одного из сигнальных путей в макрофагоподобных клетках. Так, по данным FlyBase, в клетках линии S2 уровень транскрипции *Relish* существенно выше *Dif/Dorsal* [10]. Поэтому, возможно, в клетках S2 преобладающим путем активации иммунного ответа является путь IMD. Косвенно это также подтверждается экспрессией преимущественно IMD-зависимых генов АМП, таких как *CecA1* и *Dro* (рис. 1б). Во-вторых, поскольку линия клеток S2 была выведена из 20–24-часовых эмбрионов, то, возможно, иммунная система на этой стадии развития мух сформирована не полностью. При этом, вероятно, активируются гены, которые могут обеспечить эмбриону устойчивую иммунную защиту.

Ранее было показано, что уровень транскрипции гена *CG45045* практически не меняется у молодых самцов дрозофилы (0–2 дня) после инфицирования *M. luteus* [4]. В то же время наши данные свидетельствуют о существенном усилении транскрипции *CG45045* после обработки клеток S2 бактериями *E. coli* и *M. luteus* (рис. 2а). Наиболее высокий уровень активации наблюдается в интервале между 6 и 24 часами инкубации клеток S2 с патогенами (рис. 2а). Интересно, что паттерны активации *CG45045* схожи после индукции иммунного ответа как *E. coli*, так и *M. luteus*. Это может свидетельствовать о наличии общих механизмов активации

CG45045 в клетках S2 в ответ на присутствие этих бактерий. Важно отметить, что в предыдущих исследованиях авторы анализировали уровень транскрипции *CG45045* только у молодых мух [4]. В связи с этим влияние патогенов на экспрессию *CG45045* на других стадиях развития мух остается неясным. Учитывая, что линия клеток S2 была получена из поздних эмбрионов, дальнейшие исследования должны быть направлены на изучение роли *CG45045* на эмбриональной стадии развития. Кроме того, данные базы FlyBase указывают на то, что транскрипция *CG45045* значительно усиливается у стареющих мух [10]. Высокий уровень экспрессии генов иммунного ответа на поздних стадиях развития может быть связан с хроническими воспалительными процессами, которые, в свою очередь, влияют на продолжительность жизни [11]. Поэтому изучение функций *CG45045* на поздних стадиях развития мух также представляет большой интерес.

Таким образом, мы изучили влияние инактивированных культур бактерий *E. coli* и *M. luteus* на активацию днРНК и генов, кодирующих короткие полипептиды, в клетках линии S2 (рис. 2б). В отличие от взрослых мух, в культуре клеток S2 патогены не индуцируют экспрессию генов *CG44404*, *CecC* и *BomS1/S3*. При этом нам удалось частично подтвердить результаты предварительного транскриптомного анализа, а именно то, что патогены стимулируют активацию только *CG45045*, тогда как уровень транскрипции *днРНК-CR30055* практически не изменился. Ввиду актуальности поиска и анализа новых потенциальных регуляторов, вовлеченных в иммунный ответ, в дальнейшем предстоит более детально изучить влияние патогенов на механизмы активации этих генов на различных стадиях развития мух.

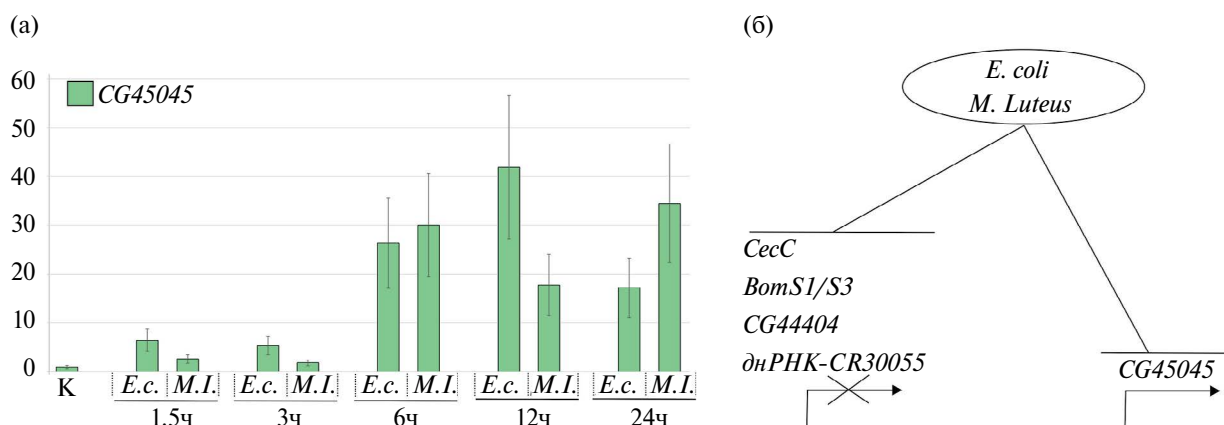


Рис. 2. Уровень транскрипции *CG45045* и модель активации этого и других генов в культуре клеток S2. (а) Клетки были обработаны инактивированными культурами *E. coli* (*E.c.*) и *M. luteus* (*M.l.*). Активацию транскрипции анализировали в следующих точках: К – 0 часов (ч), 1.5 ч, 3 ч, 6 ч, 12 ч и 24 ч. Приведены средние значения и стандартные отклонения для трех независимых экспериментов. Активация рассчитана относительно К. Отличие является статистически значимым для *CG45045* во всех точках ($p < 0.05$), кроме 1.5 ч и 3 ч. (б) Схематическая иллюстрация воздействия бактерий на транскрипцию патоген-зависимых генов в культуре клеток S2.

БЛАГОДАРНОСТИ

Количественный анализ транскриптов проводили с использованием оборудования ЦКП ИБГ РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-24-00567.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эта статья не содержит экспериментов с участием животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Govind S., Innate immunity in *Drosophila*: Pathogens and pathways, *Insect science*, 15 (2008) 29–43.
2. Buchon N., Silverman N., Cherry S. Immunity in *Drosophila melanogaster* – from microbial recognition to whole-organism physiology, *Nature reviews. Immunology*, 14 (2014) 796–810. doi: 10.1038/nri3763
3. Westlake H., Lemaitre M.A. В *The Drosophila Immunity Handbook* EPFL Press 2024.
4. Valanne S., Salminen T.S., Järvelä-Stöling M. et al., Immune-inducible non-coding RNA molecule lincRNA-IBIN connects immunity and metabolism in *Drosophila melanogaster*, *PLoS pathogens*, 15 (2019) e1007504.
5. Atianand M.K., Fitzgerald K.A. Long non-coding RNAs and control of gene expression in the immune system, *Trends in molecular medicine*, 20 (2014) 623–631.
6. Zhou H., Ni J., Wu S. et al., lncRNA-CR46018 positively regulates the *Drosophila* Toll immune response by interacting with Dif/Dorsal, *Developmental and comparative immunology*, 124 (2021) 104183.
7. Leulier F., Parquet C., Pili-Floury S. et al. The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition, *Nature immunology*, 4 (2003) 478–484.
8. Kaneko T., Golenbock D., Silverman N. Peptidoglycan recognition by the *Drosophila* Imd pathway, *Journal of endotoxin research*, 11 (2005) 383–389.
9. Lindsay S.A., Lin S.J.H., Wasserman S.A. Short-Form Bomanins Mediate Humoral Immunity in *Drosophila*, *Journal of innate immunity*, 10 (2018) 306–314.
10. Gramates L.S., Agapite J., Attrill H., et al. FlyBase: a guided tour of highlighted features, *Genetics*, 220 (2022).
11. Hanson M.A., Lemaitre B. Antimicrobial peptides do not directly contribute to aging in *Drosophila*, but improve lifespan by preventing dysbiosis, *Disease models & mechanisms*, 16 (2023).

ESCHERICHIA COLI AND MICROCOCCUS LUTEUS BACTERIA ACTIVATE THE CG45045 GENE IN THE DROSOPHILA S2 CELL LINE

Yu. A. Polunina, A. E. Pravednikova, M. Gassa, Academician of the RAS P. G. Georgiev, Yu. V. Shidlovsky, Z. M. Kachaev*

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

**e-mail: k-z-m@mail.ru*

The humoral immune system of *Drosophila*, the most studied among eukaryotes, is activated by the canonical IMD and Toll signaling pathways. Recently, new potential regulators of the innate immune response have been identified, such as long non-coding RNAs (lncRNAs) and genes encoding short polypeptides. S2 cells, being a macrophage-like cell line, are used as a model system to study the molecular mechanisms of immune response gene activation. We used this cell line to analyze the effect of *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus* bacteria on the transcription of lncRNA-CR30055 and the CG45045 and CG44404 genes encoding short polypeptides. It was found that pathogens activate only CG45045, while the transcription levels of CR30055 and CG44404 remain unchanged. No activation of the Cecropin C gene and some Bomanin family genes was observed, indicating differences in the activation patterns of immune response genes in S2 cells and adult flies. The highest activation of CG45045 was observed between 6 and 12 hours of cell incubation with pathogens. The patterns of CG45045 activation after exposure to *E. Coli* and *M. Luteus* were similar, which may indicate common mechanisms of transcriptional activation of this gene. Thus, CG45045 may be a novel gene involved in the humoral immune response of *Drosophila*.

Keywords: innate immunity, polypeptide, lncRNA, IMD, Toll

УДК 577.218

IGFBP6 МОДУЛИРУЕТ ПРОТЕОСТАЗ, АКТИВИРУЯ МИШЕНИ ATF4 И СНИЖАЯ ЭКСПРЕССИЮ РЕТРОТРАНСЛОКОНА ЭПР

© 2024 г. О. Е. Колодеева, О. Е. Колодеева, И. Д. Антипенко,
А. А. Фаткулин, М. Р. Яхина, Ю. А. Макарова*

Представлено академиком РАН В. Г. Дебабовым

Поступило 27.07.2024 г.

После доработки 17.08.2024 г.

Принято к публикации 17.08.2024 г.

Сниженная экспрессия белка IGFBP6 приводит к росту метастатического потенциала клеток рака молочной железы (РМЖ). В опухолевых клетках повышен уровень синтеза белка, что приводит к компенсаторной перенастройке протеостаза. Одним из инструментов изучения протеостаза служат белковые токсины семейства РИБ-П, необратимо инактивирующие рибосомы, в частности, вискумин. В данной работе исследовано воздействие нокдауна гена IGFBP6 на протеостаз клеток линии РМЖ MDA-MB-231. Обнаружено, что рибосомы клеток MDA-MB-231^{IGFBP6} с нокдауном IGFBP6 менее эффективно модифицируются токсином. По-видимому, это связано со снижением транспорта каталитической субъединицы вискумина из эндоплазматического ретикулума (ЭПР) в цитоплазму. В клетках MDA-MB-231^{IGFBP6} снижена экспрессия субъединиц ретротранслокона HRD1/Derlin, входящего в состав ассоциированной с ЭПР системы деградации белков (ERAD). Кроме того, обнаружен рост экспрессии мишеней фактора транскрипции ATF4, который является компонентом пути ответа ЭПР на несвернутые белки (UPR).

Ключевые слова: вискумин, ЭПР, MDA-MB-231, IGFBP6, UPR, ERAD

DOI: 10.31857/S2686738924060126

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЭПР — эндоплазматический ретикулум; UPR — unfolded protein response; ERAD — ER-associated degradation; РИБ-П — рибосом-инактивирующие белки П типа; РМЖ — рак молочной железы; ПЦР-РВ — ПЦР в реальном времени; ФТ — фактор транскрипции.

ВВЕДЕНИЕ

Для поддержания протеостаза важное значение имеет эффективный ответ клетки на накопление несвернутых белков. Его осуществляет система ответа на несвернутые белки (unfolded protein response, UPR) и связанная с ней система деградации белков, ассоциированная с ЭПР (ERAD — ER-associated degradation). В мембране

ЭПР локализованы три сенсора UPR: PERK, ATF6 и IRE1 α . Каждый из них направляет регуляторные каскады, причем ERAD активируют только ATF6 и IRE1 α [1].

Одним из инструментов изучения UPR и ERAD служат цитотоксические белки семейства РИБ-П, одним из которых является рицин. Эти белки проникают в цитоплазму с поверхности клетки, с помощью ретроградного транспорта попадая сначала в ЭПР, а затем в цитоплазму. В ЭПР происходит восстановление дисульфидной связи между двумя субъединицами токсина, после чего одна из них (А-субъединица) с помощью системы ERAD транспортируется в цитоплазму [2, 3]. С использованием рицина получен ряд важных данных о функционировании ERAD, однако его высокая токсичность служит препятствием для более детальных исследований. Хорошей альтернативой может служить родственный, но менее токсичный белок вискумин (*Mistletoe lectin I, ML-I*), содержащийся в омеле белой (*Viscum album*) и способный ингибировать синтез белка в клетке [4]. В больших дозах это приводит к гибели, однако малые дозы могут оказывать

Национальный исследовательский университет Высшая школа экономики, факультет биологии и биотехнологии, Москва, Россия

*e-mail: jmakarova@hse.ru

терапевтическое воздействие, поэтому вискумин рассматривается как антиопухолевый препарат. Основным механизмом действия, как и у ризицина, заключается в гидролизе гликозидной связи А-4324 28S рРНК, что приводит к остановке синтеза белка [5].

Ранее было показано, что клетки линии рака молочной железы MDA-MB-231 с нокдауном IGFBP6 MDA-MB-231^{IGFBP6} имеют повышенный уровень пролиферации и более высокий метастатический потенциал по сравнению с контролем [6, 7]. IGFBP6 связывает факторы роста IGF1 и IGF2. Механизм его антионкогенного действия остается малоизученным. Известно, что в связи с активной пролиферацией раковые клетки, как правило, имеют высокий уровень синтеза белка и поэтому нуждаются в корректировке протеостаза. Часто это достигается за счет повышения интенсивности UPR.

В данной работе изучено воздействие вискумина на клетки линии рака молочной железы MDA-MB-231 с нокдауном гена IGFBP6. Показана более высокая устойчивость их рибосом к токсину, причиной которой может быть сниженная экспрессия компонентов ERAD. Обнаружена активация экспрессии мишеней фактора транскрипции (ФТ) ATF4, который является частью пути UPR PERK-eIF2 α -ATF4.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии

Клетки MDA-MB-231 были трансфицированы лентивирусными векторами pLVX-shRNA1 (Clontech Laboratories, USA) с shРНК к гену IGFBP6 (линия MDA-MB-231^{IGFBP6}) и контрольной shРНК к гену люциферазы светлячка *Photinus pyralis* (линия MDA-MB-231^{luc}) [8]. Клетки MDA-MB-231^{luc} и MDA-MB-231^{IGFBP6} культивировали в культуральных флаконах 25см² (Corning, США) при 37°C с 5% CO₂ в среде DMEM/F12 (Gibco, США) с добавлением пенициллина и стрептомицина (ПанЭко, Россия) до конечной концентрации соответственно 100 ед/мл и 100 мкг/мл (ПанЭко, Россия), 10% FBS (HyClone, США) и 1% GlutaMAXTM (Gibco, США).

Оценка доли рибосом, модифицированных вискумином

Долю модифицированных рибосом определяли методом ПЦР-РВ. Использовали праймеры к 28S рРНК, соответствующие: 1) участку с немодифицированным нуклеотидом (RIP11_nmod), 2) участку с модифицированным нуклеотидом (RIP11_mod), 3) участку, отдаленному от депуринизированного сайта, для детекции всех

транскриптов 28S рРНК (RIP11_ctrl) (табл. 1). Vilo-ревертаза, доходя до депуринизированного сайта, встраивает в кДНК dATP, тогда как для интактного сайта – dTTP. На основе этой особенности детектировали модифицированные и немодифицированные участки 28S рРНК. Значения пороговых циклов ПЦР (Ct) для RIP11_ctrl использовали для нормировки значений, полученных для RIP11_mod и RIP11_nmod в каждом образце РНК.

Экстракция РНК

Клетки MDA-MB-231^{luc} и MDA-MB-231^{IGFBP6} лизировали с использованием QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN, Германия). Экстракцию РНК проводили с помощью набора miRNeasy Micro Kit (50) (QIAGEN, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию и чистоту препаратов РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Обратная транскрипция и количественная ОТ-ПЦР

Обратную транскрипцию проводили с использованием набора SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США); в реакцию брали 200 нг РНК. Использовали амплификатор DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (BioRad, США). Для проведения количественной ПЦР в реальном времени (кПЦР-РВ) использовали набор 5X qPCRMix-HS SYBR (Евроген, Россия). Последовательности используемых праймеров приведены в табл. 1. Отбор праймеров проводили с использованием программного обеспечения Primer-BLAST. Возможность образования праймерами вторичных структур (шпильки), гомо- и гетеродимеров оценивали с помощью программного обеспечения OligoAnalyzer 3.1. Температура плавления праймеров составляет 64 \pm 2°C. Конечная концентрация праймеров – 5 μ M. В реакцию добавляли кДНК, разбавленную в 15 раз свободной от нуклеаз водой для измерения экспрессии целевых генов или разбавленную в 50 000 раз для оценки доли инактивированных рибосом. Амплификацию проводили с помощью амплификатора DTprime detecting amplifier (ДНК-Технология, Россия). Проводили 35 циклов кПЦР-РВ (94°C – 20 сек, 64°C – 10 сек, 72°C – 15 сек).

Биоинформационный анализ экспрессии мРНК и белков

Для анализа транскриптомов клеток MDA-MB-231^{luc} и MDA-MB-231^{IGFBP6} использованы исходные данные секвенирования, полученные нами ранее (GSE247735) [8]. Первичные прочтения были

Таблица 1. Последовательности и эффективности праймеров

Ген	Праймер	Эффективность	Длина ПЦР продукта, п.н
HERPUD1	f-5'-ACCCCAACAATAACTTACAGGAAGG r-5'-ATAAAGGAGGGGCTGGTCTGC	1.99 ± 0.07	109
HERPUD2	f-5'-GGTCATCAGCAGGCTCCCAA r-5'-CCATCATCCATAAGACGCTCCATTT	2.06 ± 0.07	101
SEL1L	f-5'-ACCAGCTTTGACCGCCATTG r-5'-GCAGCCTCTTCTTCAGTTTCACAA	2.07 ± 0.08	189
EDEM2	f-5'-TATCGGGCTGGTCGGCAA r-5'-CCAGTCATCGAAGCGGGTGT	1.89 ± 0.08	196
AUP1	f-5'-TCAGTCCCTACCCACAGCCT r-5'-CGTCTCTCTGTGAATCTCCTTCTTG	2.13 ± 0.12	168
SYVN1	f-5'-GAGGACCGTGTGGACTTTATGGA r-5'-GGATGCTGTGATAGGCGTGG	1.97 ± 0.09	130
DERL1	f-5'-CCACACCTCAGTTTTGTACCGC r-5'-AGTTGTGTCTCCCGCTCC	1.99 ± 0.06	123
DERL2	f-5'-AGGCAGGCAGTTACAGGGTT r-5'-CTGTCAAGCAACACAGGGCT	2.15 ± 0.08	178
DERL3	f-5'-TTACACCGCAGCCTGTGTCC r-5'-CGGCAGTAGCGGAACACGA	1.93 ± 0.19	192
SEC61A1	f-5'-GTGGTCATCTATTTCCAGGGCTTC r-5'-TGCAGGATGATGGGGATGTTGG	2.17 ± 0.04	122
SEC61A2	f-5'-AAGGGTTACGGCTTGGGGTC r-5'-CCCTCAAACCTCAGTACCTCTGCC	1.93 ± 0.09	122
SEC61B	f-5'-CACCTCATCTCCAATATGCCTG r-5'-GCACTCCTTGTCACACAGC	2.02 ± 0.08	147
SEC61G	f-5'-AAGGACTCCATTGGGCTGGTT r-5'-CACCTCACATGTTCACCAAT	2.05 ± 0.04	218
RIP1I_nmod	f-5'-TGCCATGGTAATCCTGCTCAGTA r-5'-TCTGAACCTGCGGTTCCCTCT	1.87 ± 0.15	45
RIP1I_mod	f-5'-TGCCATGGTAATCCTGCTCAGTA r-5'-TCTGAACCTGCGGTTCCACA	2.0 ± 0.2	45
RIP1I_ctrl	f-5'-GATGTCGGCTCTTCCTATCATTGT r-5'-CCAGCTCACGTTCCCTATTAGTG	2.05 ± 0.2	81

предобработаны с использованием fastp 0.23.2, после чего картированы на референсный геном человека (GRCh38) с помощью STAR 2.7.10b. Анализ дифференциальной экспрессии генов был проведен при помощи R пакета DESeq2. Поправка на множественную проверку гипотез была выполнена методом Бенджамини – Хохберга. При анализе рассматривались гены со скорректированным p-value (FDR) < 0.05. К исходной матрице независимо была применена нормализация median of ratios из R пакета DESeq2, полученные значения были нормированы на длины генов (т.п.н.), что сделало возможным сравнение уровня экспрессии как между образцами, так и между генами в пределах одного образца. Для анализа протеомов клеток MDA-MB-231^{luc} и MDA-MB-231^{IGFBP6} использовали нормированные log2 значения iBAQ [6].

Для анализа представленности активированных мишеней транскрипционных факторов в линии MDA-MB-231^{IGFBP6} использовали базу данных TRRUST v2 (<https://www.grnpedia.org/trrust>).

Рассматривали только активирующие взаимодействия между ФТ и мишенями. Чтобы проанализировать значимость количества активированных мишеней каждого ФТ, использовали односторонний точный тест Фишера (fisher_exact, библиотека SciPy 1.13.1). Мишень считали активированной, если наблюдалось изменение экспрессии в линии с нокдауном более чем в 1.5 раза (FDR < 0.05) по сравнению с контрольной. Считали, что обогащение активированными мишенями ФТ наблюдается, если значение FDR точного теста Фишера было менее 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нокдаун IGFBP6 снижает эффективность модификации рибосом вискумином

В клетках MDA-MB-231^{IGFBP6} после обработки вискумином число поврежденных рибосом было ниже, чем в контрольных клетках MDA-MB-231^{luc},

Таблица 2. Доля модифицированных рибосом в клетках MDA-MB-231^{luc} и MDA-MB-231^{IGFBP6} при обработке клеток вискумином (100 нМ) в течение 6 ч, а также в течение 6 ч с последующей 24 ч инкубацией (три повтора)

Время инкубации, ч	MDA-MB-231 ^{luc} , %	MDA-MB-231 ^{IGFBP6} , %
0 (Контроль)	0 ± 0	0 ± 0
6	20.1 ± 2.8	16.8 ± 1.1
6 + 24	41.5 ± 5.8	25.2 ± 1

причем дополнительная инкубация в течение суток в среде без вискумина увеличивала эту разницу (табл. 2). Возможные причины могут состоять в менее эффективном транспорте в цитоплазму и/или более эффективной деградации вискумина клетками MDA-MB-231^{IGFBP6}.

Вискумин, как и другие токсины семейства РИБ-II, попадает из ЭПР в цитоплазму с помощью системы ERAD. Транспорт белков люмена ЭПР в цитоплазму осуществляется с помощью ретротранслокона, состоящего из Е3-убиквитинлигазы HRD1, одного из трех белков семейства дерлинов – DERL1-3, одного из белков HERPUD1 и HERPUD2, а также адапторного белка SEL1L [1]. Этот ретротранслокон вовлечен и в транспорт рицина [3]. В транспорте рицина участвует также транслокон ЭПР Sec61 [9], который тоже вовлечен в ERAD [10].

Нокдаун IGFBP6 изменяет экспрессию ряда генов, осуществляющих транспорт и деградацию субстратов ERAD

Анализ транскриптомов клеток MDA-MB-231^{luc} и MDA-MB-231^{IGFBP6} показал, что в клетках MDA-MB-231^{IGFBP6} по сравнению с контролем снижена экспрессия компонентов ретротранслокона HERPUD1 и HERPUD2. Снижение экспрессии HERPUD1 показано также с помощью кПЦР-РВ, а тенденция к снижению экспрессии HERPUD2 обнаружена в протеомах (табл. 3). Оба белка необходимы для правильной организации и функционирования ретротранслокона [1]. Также снижена экспрессия SEL1L и, кроме того, резидентного лектина ЭПР EDEM2, который инициирует ERAD белков люмена, осуществляя первую стадию удаления углеводных остатков с растворимых субстратов

Таблица 3. Экспрессия компонентов ретротранслокона HRD1/Derlin, транслокона Sec61 и некоторых вспомогательных элементов, осуществляющих транспорт растворимых белков между люменом ЭПР и цитоплазмой. Приведены данные анализа транскриптомов и протеомов MDA-MB-231^{luc}/IGFBP6, а также данные ПЦР-РВ. Кратность изменения (fold change) дана в линейной шкале. “-” – кратность изменения менее 1.1. Nd – белок не обнаружен в протеоме. Для всех значений изменений экспрессии в транскриптоме FDR < 0.001. Жирным выделены названия генов, для экспрессии которых обнаружены согласованные значимые изменения по данным анализа транскриптомов и ПЦР-РВ, и относительная экспрессия которых в транскриптомах выше 1.0

Название гена	Транскриптом, относительная экспрессия		Кратность изменения	ПЦР		Протеом		Сниженная экспрессия защищает от рицина
	MDA-MB-231 ^{luc}	MDA-MB-231 ^{IGFBP6}		Кратность изменения	FDR	Кратность изменения	FDR	
Ретротранслокон <i>HRD1/Derlin</i> и ассоциированные белки								
<i>HERPUD1</i>	93.6	66.0	−1.4	−1.6	3e-3	Nd		+ [13]
<i>HERPUD2</i>	70.3	54.2	−1.3	−1.2	0.20	−2.0	0.59	+ [13]
<i>SEL1L</i>	134.1	1069	−1.3	1.2	0.19	−1.1	0.90	+ [13]
<i>HRD1 (SYVN1)</i>	125.6	125.4	−	−1.3	0.09	Nd		−
<i>DERL1</i>	79.3	72.5	−1.1	−1.1	0.59	−1.8	0.38	+ [13]
<i>DERL2</i>	71.7	67.7	−1.1	1.1	0.85	1.9	0.34	+ [13]
<i>DERL3</i>	0.7	0.4	−1.6	−5.5	9e-7	Nd		+ [13]
<i>EDEM2</i>	84.2	50.0	−1.7	−1.5	0.01	Nd		+ [3]
<i>AUP1</i>	317.0	621.6	2.0	1.5	0.01	2.4	0.02	−
Транслокон <i>Sec61</i>								
<i>SEC61A1</i>	391.2	402.7	−	−	0.86	1.3	0.25	−
<i>SEC61A2</i>	35.3	43.8	1.2	−2.2	3e-3	Nd		−
<i>SEC61B</i>	255.1	188.7	−1.4	−1.8	0.04	1.1	0.13	−
<i>SEC61G</i>	84.7	109.5	1.3	−	0.87	1.1	0.25	−

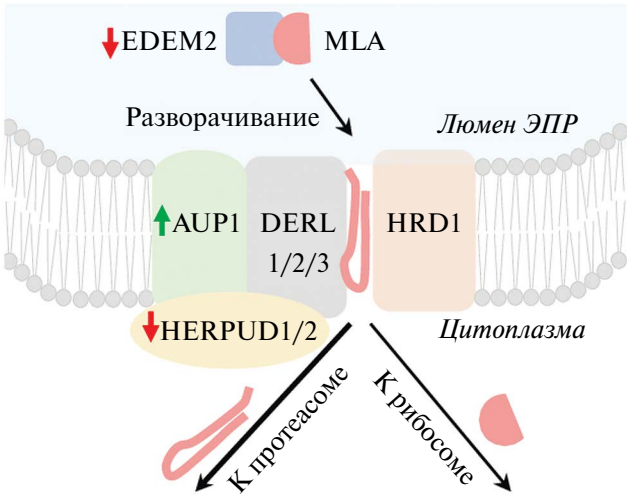


Рис. 1. Снижение экспрессии EDEM2 и компонента ретротранслокона HERPUD1/2 может уменьшать транспорт вискумина из ЭПР в цитоплазму, а рост экспрессии AUP1 — приводить к росту убиквитинирования и деградации вискумина. MLA — А-субъединица вискумина.

ERAD [11]. EDEM2 направляет растворимые субстраты ERAD, а также рибин [12], к транслокону. Описанные изменения могут способствовать снижению транспортировки субстратов ERAD, включая, вероятно, родственную рибину вискумин, из ЭПР в цитоплазму (рис. 1). Сниженная экспрессия DERL3, вероятно, не оказывает влияние на интенсивность транспорта, поскольку ген почти не экспрессируется в обеих линиях (табл. 3). Следует отметить, что для всех белков ретро-транслокона HRD1/Derlin показано их участие в транспорте рибина при полногеномном скрининге с помощью shRNA [13] либо в отдельных экспериментах [3], табл. 3.

Помимо этого, и на основе анализа транскриптомов, и с помощью кПЦР-РВ обнаружено снижение экспрессии субъединицы SEC61B транслокона Sec61 (табл. 3). Снижение экспрессии SEC61B может вносить вклад в сниженную доступность рибосом MDA-MB-231^{IGFBP6} для вискумина.

В то же время, с помощью всех трех методов анализа обнаружен рост экспрессии гена *AUP1* (табл. 3), задействованного в убиквитинировании

транслоцированных в цитоплазму через транслокон HRD1/Derlin субстратов ERAD [1]. Это, вероятно, может способствовать более интенсивной деградации субстратов ERAD, включая вискумин, клетками MDA-MB-231^{IGFBP6} (Рис.1). Описанные изменения свидетельствуют об изменениях в системе ERAD и могут вносить вклад в меньшую доступность рибосом для вискумина в клетках MDA-MB-231^{IGFBP6}.

Нокдаун IGFBP6 активирует мишени ATF4 — ФТ, опосредующего UPR

Для всех ФТ проанализировали изменение экспрессии их генов-мишеней с помощью гипергеометрического теста. В табл. 4 представлены ФТ, активированные мишени которых в линии MDA-MB-231^{IGFBP6} значимо перепредставлены (экспрессия гена-мишени увеличивается более чем в 1.5 раза, FDR < 0.05). Наибольшую долю таких мишеней имеет ATF4 — ФТ, активируемый резидентным сенсором ЭПР PERK, который запускает UPR при стрессе ЭПР.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что нокдаун IGFBP6 усиливает пролиферацию, а также метастатический потенциал клеток MDA-MB-231 [6]. Раковые клетки в связи с усиленной пролиферацией имеют высокий уровень синтеза белка, что создает нагрузку на механизмы фолдинга. Поэтому во многих типах рака, включая РМЖ, происходит компенсаторная активация UPR, что позволяет перенастроить протеостаз под нужды раковой клетки [14, 15]. Активация ATF4 в клетках MDA-MB-231^{IGFBP6} может вносить вклад в такую активацию UPR.

Три других ФТ (табл. 4) — активаторы транскрипции, усиливающие клеточную пролиферацию. Их активация при сниженной экспрессии IGFBP6 может вносить вклад в усиление онкогенного фенотипа клеток MDA-MB-231^{IGFBP6}.

Кроме того, и Jun, и Мус вовлечены в комплексную регуляцию UPR. Jun активируется в ответ на UPR и, в свою очередь, активирует UPR, связываясь с промоторами участвующих в нем генов, в том числе с промотором ATF4 [16]. Мус также активирует гены UPR, связываясь, в частности, с промотором ATF4, а ATF4 стабилизирует Мус, препятствуя его протеасомной деградации [17]. Rela является субъединицей NFκB,

Таблица 4. ФТ с наиболее высокой долей активированных мишеней

ФТ	Отношение шансов	Число активированных мишеней/число всех мишеней	p-value	FDR
ATF4	6.10	8/21	3e-4	0.04
JUN	4.20	19/64	3e-6	1e-3
MYC	3.82	15/54	7e-5	0.01
RELA	2.43	31/158	4e-5	0.01

который активируется при UPR, в том числе через путь PERK-ATF4 [18].

Интересно, что несмотря на увеличение активности UPR, не обнаружен рост ERAD. Возможно, это связано с тем, что ERAD активируется не PERK-ATF4, а сенсорами IRE1 α и ATF6, экспрессия которых не изменилась.

Таким образом, в результате обработки вискумином в клетках РМЖ MDA-MB-231^{IGFBP6} инактивируется меньшее число рибосом по сравнению с контролем. Это может быть связано со сниженным транспортом токсина из ЭПР в цитоплазму, обусловленным снижением экспрессии элементов системы ERAD, а также с его более эффективной протеасомной деградацией. Рост экспрессии мишеней ФТ ATF4 свидетельствует об активации UPR. Изменения экспрессии компонентов ERAD и UPR свидетельствуют об изменении протеостаза в результате снижения экспрессии IGFBP6. Отрицательная корреляция активности UPR с уровнем экспрессии IGFBP6 может вносить вклад в антионкогенный эффект этого гена.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проводилось в рамках проекта “Создание экспериментальных научно-исследовательских лабораторий по естественно-научным направлениям” и программы фундаментальных исследований НИУ ВШЭ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Работа выполнена на клеточной линии рака молочной железы MDA-MB-231. В исследовании отсутствовало изучение человека и животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что не имеют конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Christianson J.C., Jarosch E., Sommer T. Mechanisms of substrate processing during ER-associated protein degradation // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2023. Т. 24. № 11. С. 777–796.
2. Agapov I.I. u др. Mistletoe lectin dissociates into catalytic and binding subunits before translocation across the membrane to the cytoplasm // *FEBS Letters.* 1999. Т. 452. № 3. С. 211–214.
3. Sowa-Rogozńska N. u др. Intracellular Transport and Cytotoxicity of the Protein Toxin Ricin // *Toxins.* 2019. Т. 11. № 6. С. 350.
4. Niwa H. u др. Crystal structure at 3 Å of mistletoe lectin I, a dimeric type-II ribosome-inactivating protein, complexed with galactose // *European Journal of Biochemistry.* 2003. Т. 270. № 13. С. 2739–2749.
5. Tonevitsky A.G. u др. Immunotoxins containing A-chain of mistletoe lectin I are more active than immunotoxins with ricin A-chain // *FEBS Letters.* 1996. Т. 392. № 2. С. 166–168.
6. Nikulin S. u др. Effect of the Expression of ELOVL5 and IGFBP6 Genes on the Metastatic Potential of Breast Cancer Cells // *Front. Genet.* 2021. Т. 12. С. 662843.
7. Samatov T.R. u др. Novel biomarkers in cancer: The whole is greater than the sum of its parts // *Seminars in Cancer Biology.* 2017. Т. 45. С. 50–57.
8. Shkurnikov M. u др. IGFBP6 regulates extracellular vesicles formation via cholesterol abundance in MDA-MB-231 cells // *Biochimie.* 2024.
9. Wesche J., Rapak A., Olsnes S. Dependence of Ricin Toxicity on Translocation of the Toxin A-chain from the Endoplasmic Reticulum to the Cytosol // *Journal of Biological Chemistry.* 1999. Т. 274. № 48. С. 34443–34449.
10. Schäfer A., Wolf D.H. Sec61p is part of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery // *EMBO J.* 2009. Т. 28. № 19. С. 2874–2884.
11. Ninagawa S. u др. EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step // *Journal of Cell Biology.* 2014. Т. 206. № 3. С. 347–356.
12. Słomińska-Wojewódzka M. u др. The role of EDEM2 compared with EDEM1 in ricin transport from the endoplasmic reticulum to the cytosol // *Biochemical Journal.* 2014. Т. 457. № 3. С. 485–496.
13. Bassik M.C. u др. A Systematic Mammalian Genetic Interaction Map Reveals Pathways Underlying Ricin Susceptibility // *Cell.* 2013. Т. 152. № 4. С. 909–922.
14. Galatenko V.V. u др. Highly informative marker sets consisting of genes with low individual degree of differential expression // *Sci Rep.* 2015. Т. 5. № 1. С. 14967.
15. Patra A., Adhikary A., Ghosh S. The unfolded protein response (UPR) pathway: the unsung hero in breast cancer management // *Apoptosis.* 2023. Т. 28. № 3–4. С. 263–276.
16. Zhou C. u др. JUN is a key transcriptional regulator of the unfolded protein response in acute myeloid leukemia // *Leukemia.* 2017. Т. 31. № 5. С. 1196–1205.
17. Zhang T. u др. MYC and the unfolded protein response in cancer: synthetic lethal partners in crime? // *EMBO Mol Med.* 2020. Т. 12. № 5. С. e11845.
18. Tam A.B. u др. ER Stress Activates NF- κ B by Integrating Functions of Basal IKK Activity, IRE1 and PERK // *PLoS ONE.* 2012. Т. 7. № 10. С. e45078.

IGFBP6 MODULATES PROTEOSTASIS BY ACTIVATING ATF4 TARGETS AND REDUCING ER RETROTRANSLOCON EXPRESSION

**O. E. Kolodeeva, O. E. Kolodeeva, I. D. Antipenko, A. A. Fatkulin,
M. R. Yakhina, J. A. Makarova***

Faculty of Biology and Biotechnology, HSE University, Moscow, Russian Federation

**e-mail: jmakarova@hse.ru*

Presented by Academician of the RAS V.G. Debabov

Reduced expression of the IGFBP6 protein leads to an increase in the metastatic potential of breast cancer (BC) cells. The level of protein synthesis in tumour cells is increased, leading to a compensatory adjustment of proteostasis. One of the tools used to study proteostasis is protein toxins of the RIP-II family, which irreversibly inactivate ribosomes (particularly, viscumin). We investigated the effect of IGFBP6 gene knockdown on the proteostasis in the BC cell line MDA-MB-231. Ribosomes from MDA-MB-231^{IGFBP6} cells are less efficiently modified by the toxin. This is probably due to the reduced transport of the viscumin catalytic subunit from the ER to the cytoplasm. MDA-MB-231^{IGFBP6} cells showed reduced expression of the retrotranslocon HRD1/Derlin subunit, which is a component of the ER-associated protein degradation system (ERAD). For ATF4 transcription factor, which is a part of the ER unfolded protein response pathway (UPR), an increased expression of its targets was found.

Keywords: viscumin, ER, MDA-MB-231, IGFBP6, UPR, ERAD

УДК 577.218

ЭФФЕКТЫ ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ СУБЪЕДИНИЦ SAYP, VAP170 КОМПЛЕКСА РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОМАТИНА У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2024 г. В. К. Чмыхало^{1*}, Ю. В. Шидловский¹, Л. А. Лебедева¹,
иностраннный член РАН P. Schedl², E. Giordano³

Поступило 20.08.2024 г.

После доработки 31.08.2024 г.

Принято к публикации 01.09.2024 г.

Проанализированы фенотипические проявления повышенной экспрессии генов *Vap170* и *e(y)3* (*SAYP*) у *D. melanogaster*. На модели крыловых дисков показано, что совместное умеренное повышение экспрессии генов *Vap170* и *e(y)3* приводит к нарушению жилкования крыльев, предположительно связанное с подавлением сигнальных путей EGFR/Ras/MAPK. Сильная индукция совместной экспрессии указанных генов в крыловых дисках приводит к полному подавлению развития крыльев у взрослых особей. Убиквитарная совместная экспрессия *Vap170* и *e(y)3* летальна на стадии личинок 1 возраста и сопровождается формированием меланотических опухолей. Указанные фенотипы наблюдаются только при совместной экспрессии *Vap170* и *e(y)3*. Это указывает на сильный синергизм действия этих генов, гиперактивность которых проявляется в нарушении пролиферации и дифференцировки клеток.

Ключевые слова: SWI/SNF комплексы, PBAP, Vap170, ARID2, SAYP, сигнальный путь EGFR/Ras/MAPK

DOI: 10.31857/S2686738924060135

Ремоделирование хроматина является одним из фундаментальных процессов регуляции состояния эпигенетического ландшафта и активности генов. Данный процесс у всех эукариот осуществляется эволюционно-консервативными АТФ-зависимыми комплексами ремоделирования хроматина – ISWI, CHD/Mi-2, INO80 и SWI/SNF [1]. Последний является специфичным фактором для активации транскрипции широкого спектра генов. Особенностью SWI/SNF комплекса является модульное строение с вариабельностью субъединиц, что связано с формированием нескольких функционально отличающихся подсемейств. Главные подсемейства SWI/SNF отличаются набором белков, которые составляют регуляторный модуль и вовлечены в процессы распознавания ДНК и РНК, эпигенетических модификаций гистонов, а также

взаимодействие с разнообразными транскрипционными факторами. У дрозофилы выделяют канонический комплекс ВАР (содержащий в регуляторном модуле субъединицы *osa* и *d4*), неканонический *ncBAP*/*GBAP* (содержащий субъединицы *bica* и *Brd7-9*) и *PBAP* (*Polybromo*-содержащий ВАР, содержащий субъединицы *Polybromo*, *Brd7-9*, *SAYP* и *Vap170*) [1–3]. Белки *SAYP* (кодируется геном *e(y)3*) и *Vap170* являются незаменимыми в развитии, их отсутствие летально [2, 4, 5].

Несмотря на понимание различий в структуре комплексов, функциональные отличия ВАР, *ncBAP* и *PBAP* подсемейств описаны еще недостаточно. Одна из важнейших функций комплекса *PBAP* – участие в энхансер-зависимой регуляции активности генов [6] и регуляция экспрессии генов-мишеней различных сигнальных путей [7], что определяется взаимодействием ремоделера с различными транскрипционными факторами. Подсемейство *PBAP* участвует в транскрипции генов-мишеней фактора *Stat* и рецептора *Hr3* за счет взаимодействия этих факторов с *SAYP* [8, 9]. Для другого компонента *PBAP* – *Vap170* – перечень взаимодействий описан слабо. *Vap170* (гомолог *ARID2* млекопитающих) относится к семейству

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

²Принстонский университет, Принстон, США

³Università di Napoli Federico II, Naples, Italy.

*e-mail: vkchmykhala@icloud.com

ARID (AT-interacting domain) доменных белков, что позволяет им связываться АТ-богатыми мотивами ДНК. Также в структуре Bap170 выделяют другой ДНК-связывающийся домен — RFX, а также повторы аминокислотного мотива LxxLL и два цинковых пальца типа C₂H₂-типа на С-конце [4]. Предположительно, Bap170 задействован в привлечении РВАР на целевые локусы [7].

Ранее на модели морфогенеза крыльев было показано, что Bap170 является антагонистом сигнального каскада рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), протоонкогена Ras и митоген-активируемых киназ (МАРК) [4]. Для ряда мутаций в генах, кодирующих компоненты указанных путей, характерен фенотип нарушенного жилкования, при котором наблюдается недоразвитие жилок на крыльях. Гипоморфная мутация *Bap170* частично спасает данный фенотип и способствует восстановлению жилкования. Интересно, что гипоморф SAYP сам по себе также стимулирует формирование дополнительного материала жилок на крыльях [8].

Мы проверили поведение SAYP и Bap170 на данной модели также с помощью альтернативного метода — повышения уровня данных белков. Для этого мы использовали линии мух, несущих конструкции с кДНК белков Bap170 или SAYP под контролем UAS [4], сделанный с помощью вектора pUAST, в сочетании с различными GAL4-драйверами (рис. 1).

В первых экспериментах мы использовали драйвер *Omb*, имеющий специфичную экспрессию

в крыловых имагинальных дисках личинки дрозофилы.

Ранее было показано, что повышенная экспрессия доминант-негативной формы *Ras1 RasN17* в крыловом диске приводит к недоразвитию жилки L4, однако при одновременном повышении уровня *Bap170* в диске фенотип усугубляется: в большей степени нарушается формирование жилки L4, также нарушается жилка L3 [4]. Мы проверили нарушение жилкования при повышении экспрессии SAYP в этой системе. Оказалось, что формируется очень схожий фенотип: часть жилок L3 и L4 практически не развивается дистальнее задней поперечной жилки. Эффект повышенной экспрессии SAYP — более выраженный, чем у *Bap170*: также видны нарушения в границе дистального края от латеральных жилок L2 до L4 (фенотип *Ser*), в дистальной части L2 подвергается искривлению в постериальном направлении (рис. 2).

Таким образом, SAYP и Bap170 ведут себя очень сходно в процессах, контролирующих экспрессию генов, вовлеченных в жилкование крыла. На фоне низкой активности каскадов EGFR/Ras/MAPK повышенный уровень SAYP или Bap170 усиливает фенотип крыла, характерного для делеций компонентов указанных каскадов. Необходимо отметить, что в формировании края крыла также вносят вклад сигнальные пути Notch и Wnt, поэтому молекулярная интерпретация данного фенотипа требует дополнительной проверки.

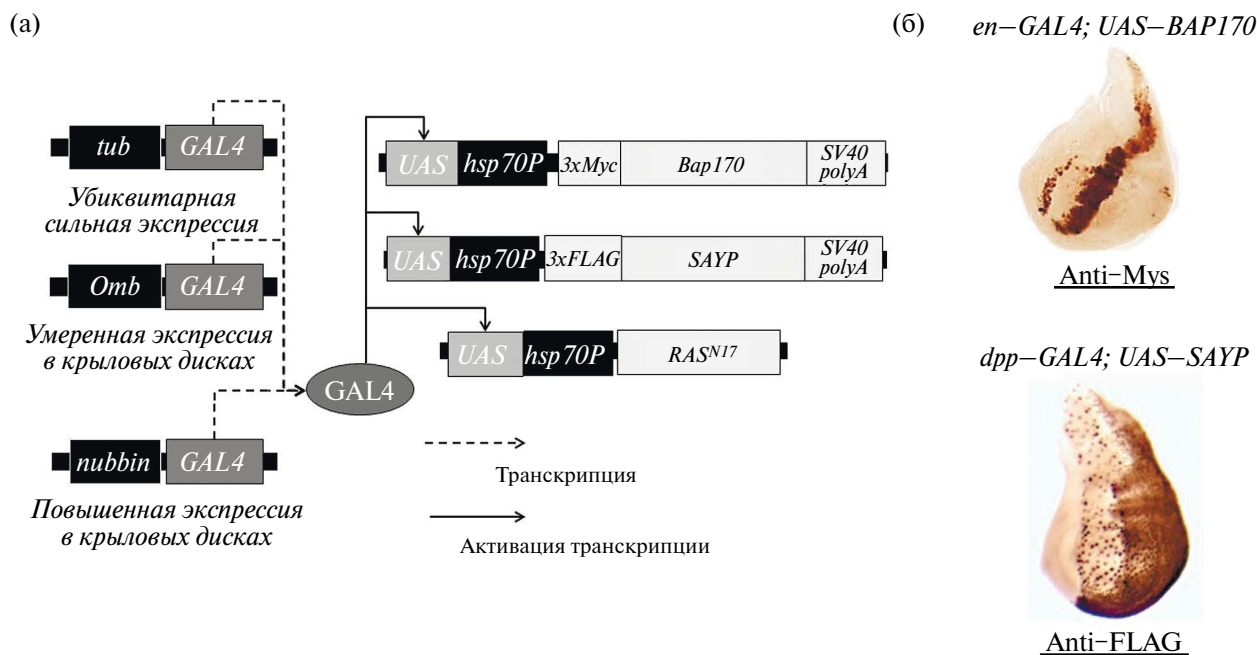


Рис. 1. А — Используемые генетические конструкции Bap170 и SAYP для экспрессии с помощью системы GAL4-UAS, Б — Детекция трансгенных белков BAP170 и SAYP антителами к эпитопам 3xMyc и 3xFLAG соответственно в имагинальных дисках крыльев.

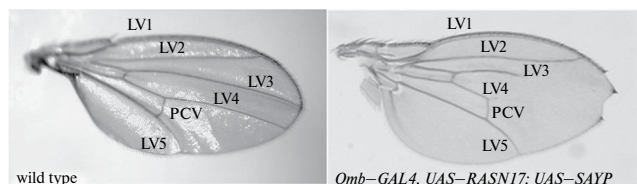


Рис. 2. Повышенная экспрессия *SAYP* на фоне экспрессии *RasN17* усугубляет фенотип нарушенного жилкования.

Повышенная экспрессия факторов *SAYP* или *Var170* с использованием промотора *Omb* у мух дикого типа не имеет фенотипического проявления. Однако повышение экспрессии одновременно и *SAYP*, и *Var170* приводит к потере ряда жилок на крыльях, при этом формируется фенотип, схожий с описанным выше. Недоразвитие жилкования наблюдается также при совместной экспрессии *SAYP* и мутантных форм *Var170* с делецией ARID домена или LXXL мотива [4]. Интересно, что ко-экспрессия *SAYP* и *Var170* без цинковых пальцев не приводит к формированию такого мутантного фенотипа, что указывает, скорее всего, на роль этого домена в формировании контакта с *SAYP*.

Повышенная экспрессия *SAYP* совместно с *Var170* в крыловых дисках под контролем промотора *nubbin* с более сильной и широкой экспрессией, чем *Omb*, полностью подавляет развитие крыльев (рис. 3). При этом мухи с экспрессией *SAYP* или *Var170* при использовании данного драйвера имеют фенотип дикого типа. Это косвенно указывает на критически важную роль РВАР в контроле пролиферации и дифференцировки клеток крыловых дисков.

Повышенная экспрессия *Var170* с использованием убиквитарного промотора тубулина не имеет фенотипического проявления [4]. Мы также проверили фенотип мух с повышенной убиквитарной экспрессией *SAYP* и не обнаружили явных фенотипических проявлений. Однако убиквитарная совместная повышенная экспрессия *SAYP* и *Var170* летальна для личинок первого возраста. При этом



Рис. 3. Повышенная экспрессия субъединиц *SAYP* и *Var170* в крыловых дисках приводит к полному отсутствию крыльев у взрослых мух *D. melanogaster*.

у погибших личинок наблюдается формирование меланотических опухолей. Данный тип опухолей связан с гематopoэтическими клетками и возникает в результате гиперактивации сигнальных путей иммунного ответа и гематopoэза Toll/NF- κ B и Jak/Stat92E [10]. Сигнальные пути Ras и AP-1 также контролируют пролиферацию и дифференцировку клеток гемолимфы, их нарушения дают схожий фенотип [11].

Наши данные позволяют заключить, что факторы *SAYP* и *Var170*, являющиеся партнерами в РВАР [3], также тесно связаны с собой функционально. Эффект повышенной экспрессии этих субъединиц по-отдельности не проявляется у мух дикого типа, но их совместная экспрессия вызывает существенные нарушения в развитии. Ранее было показано, что специфические субъединицы подсемейства РВАР стабилизируют друг друга в клетке [12]. Вероятно, только совместная экспрессия этих белков позволяет повысить их уровень в клетке, экспрессия по-отдельности является неэффективной. Как показали данные совместной экспрессии *SAYP* и мутантных форм *Var170*, скорее всего, цинковые пальцы белка *Var170* являются доменом, осуществляющим его взаимодействие с *SAYP*. Со стороны *SAYP*, как показано ранее, взаимодействующим доменом является *SAY* [3]. В структуре РВАФ комплекса млекопитающих наблюдаются схожие закономерности [13], поэтому можно ожидать схожих эффектов взаимной стабилизации субъединиц.

Полученные данные позволяют выдвинуть следующие гипотезы об участии *SAYP* и *Var170* в работе сигнальных путей. Полное отсутствие крыльев в системе *nubbin-Gal4; UAS-SAYP, UAS-BAP170* схоже с фенотипом подавления сигнального пути Hedgehog [14]. Можно отметить, что в морфогенезе крыла, а конкретно — в процессах жилкования, предполагается, что эффекты активации сигнальных каскадов EGFR/Ras/MAPK основаны на ингибировании транскрипционного репрессора Gro [15]. Gro, в свою очередь, подавляет транскрипционную активность фактора Su(H) — компонента пути Hedgehog [15]. Ранее было показано, что разные делеции *Var170* приводят к схожему фенотипу, характерного для гиперактивации каскада Ras или для повышенной экспрессии *dpp*, что косвенно может указывать на взаимодействие РВАР с Gro [4]. С другой стороны, известно что сигнальный путь JAK/Stat92E ограничивает активность сигнальных каскадов EGFR/Ras/MAPK [16]. Вероятно, именно Stat92E привлекает комплекс РВАР к локусам генов-ингибиторов каскада EGFR/Ras/MAPK (например, *argo*). В пользу предположения кооперации РВАР и Stat92E также говорит образование меланотических опухолей у личинок [17]. Суммируя сказанное, негативная регуляция каскадов EGFR/Ras/MAPK комплексом РВАР на эпигенетическом уровне, скорее всего,

может осуществляться посредством кооперации с такими факторами, как Gro, Мус и Stat92Е, однако данные предположения требуют дальнейшего подтверждения.

Интересно отметить, что у человека мутации *ARID2* связаны с развитием различных типов рака (поджелудочной железы, кожи, головы, шеи и других), пролиферативных болезнями крови. Ортолог SAYP – PHF10 – контролирует гематопоез, взаимодействует с онкогеном MYC [18] и опосредует активность NF-κB [19], FOS [20]. Это указывает на функциональную преемственность в процессах формирования опухолей у данных субъединиц у разных видов животных.

БЛАГОДАРНОСТИ

Количественный анализ транскриптов проводили с использованием оборудования ЦКП ИБГ РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского Научного Фонда 20-14-00201-П.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Поскольку дрозофила является насекомым, специальное разрешение комиссии по биоэтике не требуется.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. SWI/SNF Complex Connects Signaling and Epigenetic State in Cells of Nervous System [Text] / Chmykhalo, V.K. et al. // Mol Neurobiol. – 2024. – Vol. N – P.
2. A novel multidomain transcription coactivator SAYP can also repress transcription in heterochromatin [Text] / Shidlovskii, Y.V. et al. // EMBO J. – 2005. – Vol. 24, N 1. – P. 97–107.
3. Transcription coactivator SAYP combines chromatin remodeler Brahma and transcription initiation factor TFIID into a single supercomplex [Text] / Vorobyeva, N.E. et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2009. – Vol. 106, N 27. – P. 11049–11054.
4. Bap170, a subunit of the Drosophila PBAP chromatin remodeling complex, negatively regulates the EGFR signaling [Text] / Rendina R. et al. // Genetics. – 2010. – Vol. 186, N 1. – P. 167–181.
5. The novel regulator of metazoan development SAYP organizes a nuclear coactivator supercomplex [Text] / Vorobyeva N.E. et al. // Cell Cycle. – 2009. – Vol. 8, N 14. – P. 2152–2156.
6. Subunits of the PBAP Chromatin Remodeler Are Capable of Mediating Enhancer-Driven Transcription in Drosophila [Text] / Shidlovskii Y.V. et al. // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol. 22, N 6. – P. 2856.
7. Functional differentiation of SWI/SNF remodelers in transcription and cell cycle control [Text] / Moshkin Y.M. et al. // Mol Cell Biol. – 2007. – Vol. 27, N 2. – P. 651–661.
8. Transcription co-activator SAYP mediates the action of STAT activator [Text] / Panov V.V. et al. // Nucleic Acids Res. – 2012. – Vol. 40, N 6. – P. 2445–2453.
9. SAYP interacts with DHR3 nuclear receptor and participates in ecdysone-dependent transcription regulation [Text] / Vorobyeva N.E. et al. // Cell Cycle. – 2011. – Vol. 10, N 11. – P. 1821–1827.
10. Melanotic mutants in Drosophila: pathways and phenotypes [Text] / Minakhina S., and Steward R. // Genetics. – 2006. – Vol. 174, N 1. – P. 253–263.
11. A directed screen for genes involved in Drosophila blood cell activation [Text] / Zettervall C.J. et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2004. – Vol. 101, N 39. – P. 14192–14197.
12. The transcriptional coactivator SAYP is a trithorax group signature subunit of the PBAP chromatin remodeling complex [Text] / Chalkley G.E. et al. // Mol Cell Biol. – 2008. – Vol. 28, N 9. – P. 2920–2929.
13. Systematic characterization of BAF mutations provides insights into intracomplex synthetic lethalties in human cancers [Text] / Schick, S. et al. // Nat Genet. – 2019. – Vol. 51, N 9. – P. 1399–1410.
14. A genome-wide transgenic resource for conditional expression of Drosophila microRNAs [Text] / Bejarano F. et al. // Development. – 2012. – Vol. 139, N 15. – P. 2821–2823.
15. Crosstalk between the EGFR and other signalling pathways at the level of the global transcriptional corepressor Groucho/TLE [Text] / Hasson P., and Paroush Z. // Br J Cancer. – 2006. – Vol. 94, N 6. – P. 771–775.
16. JAK/STAT controls organ size and fate specification by regulating morphogen production and signalling [Text] / Recasens-Alvarez C. et al. // Nat Commun. – 2017. – Vol. 8, N 13815. – P. 13815.
17. Tumor models in various Drosophila tissues [Text] / Gong S. et al. // WIREs Mech Dis. – 2021. – Vol. 13, N 6. – P. e1525.
18. PHF10 subunit of PBAF complex mediates transcriptional activation by MYC [Text] / Soshnikova N.V. et al. // Oncogene. – 2021. – Vol. 40, N 42. – P. 6071–6080.

19. Double plant homeodomain (PHD) finger proteins DPF3a and -3b are required as transcriptional co-activators in SWI/SNF complex-dependent activation of NF-kappaB RelA/p50 heterodimer [Text] / Ishizaka A. et al. // J Biol Chem. — 2012. — Vol. 287, N 15. — P. 11924–11933.
20. [PHF10, a Subunit of the PBAF Chromatin Remodeling Complex, Changes Its Localization and Interacts with c-FOS during the Initiation of Long-Term Potentiation in Neuronal Culture] [Text] / Azieva A.M. et al. // Mol Biol (Mosk). — 2021. — Vol. 55, N 6. — P. 1021–1029.

EFFECTS OF OVEREXPRESSION OF SPECIFIC SUBUNITS SAYP, BAP170 OF THE CHROMATIN REMODELING COMPLEX IN DROSOPHILA MELANOGASTER

**V. K. Chmykhala^a, *, Y. V. Shidlovskii^a, L. A. Lebedeva^a,
foreign member of RAS P. Schedl^b, E. Giordano^c**

^a*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Laboratory of Gene Expression Regulation in Development,
Moscow, Russian Federation*

^b*Princeton University, Princeton, USA*

^c*Università di Napoli Federico II, Naples, Italy.*

*e-mail: vkchmykhala@icloud.com

The phenotypic manifestations of increased expression of the *Bap170* and *e(y)3* (*SAYP*) genes in *D. melanogaster* were analyzed. Using the wing disc model, we show that moderate co-expression of *Bap170* and *e(y)3* genes in wing discs leads to abnormalities in wing veining, which was probably caused by suppression of EGFR/Ras/MAPK signaling pathways. Strong induction of co-expression of the above genes in wing discs leads to complete suppression of wing development in adults. Ubiquitous co-expression of *Bap170* and *e(y)3* is lethal at the 1st instar larval stage and leads to the formation of melanotic tumors. The above phenotypes are observed exclusively when *Bap170* and *e(y)3* are co-expressed. This evidence suggests a robust synergistic effect of the combined action of these genes, which is manifested in the hyperactivity of cell proliferation and differentiation.

Keywords: SWI/SNF complexes, PBAP, Bap170, ARID2, SAYP, EGFR/Ras/MAPK signaling pathway

УДК 577.121:[597.552.512: 639.3.04]

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА У РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ (*ONCORHYNCHUS MYKISS* WALB.) ПРИ ВВЕДЕНИИ КРУГЛОСУТОЧНОГО ОСВЕЩЕНИЯ В УСЛОВИЯХ АКВАКУЛЬТУРЫ ЮЖНОГО РЕГИОНА РФ

© 2024 г. М. А. Родин, М. В. Кузнецова*, М. Ю. Крупнова, А. Е. Курицын,
академик РАН Н. Н. Немова

Поступило 10.08.2024 г.

После доработки 25.08.2024 г.

Принято к публикации 30.08.2024 г.

У радужной форели *Oncorhynchus mykiss* Walb., выращиваемой в условиях аквакультуры на предприятии в Северной Осетии — Алании, исследовали активность ферментов энергетического и углеводного обмена (цитохром *c* оксидазы, пируваткиназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 1-глицерофосфатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, альдолазы) при введении режима, включающего круглосуточное освещение и ночное кормление. Согласно результатам исследования, активность цитохром *c* оксидазы и пируваткиназы в печени рыб из экспериментальной группы была достоверно выше, чем у контрольных особей, что свидетельствует о повышении уровня аэробного обмена синтеза АТФ. Активность альдолазы в органах рыб, выращиваемых при круглосуточном освещении, была ниже по сравнению с рыбами из контрольной группы, что указывает на снижение уровня использования углеводов в гликолизе в мышцах и интенсивности глюконеогенеза в печени. Выявленные различия позволяют предположить, что при введении круглосуточного освещения и ночного кормления наблюдаются метаболические перестройки в энергетическом и углеводном обмене, способствующие процессам биосинтеза и, соответственно, приросту массы рыб.

Ключевые слова: радужная форель, энергетический обмен, активность ферментов, фотопериод

DOI: 10.31857/S2686738924060144

ВВЕДЕНИЕ

Фотопериод (отношение количества световых часов к часам темноты за 24 часа) влияет на некоторые показатели продуктивности рыб в культуре, инициируя ряд изменений в их росте, питании и репродуктивной функции [1]. На основании экспериментальных данных [2] было высказано предположение о том, что влияние длительного искусственного фотопериода на ростовые характеристики рыб, вероятно, связано с перераспределением доступной энергии, которая “перенаправляется” от развития гонад на соматический рост. В связи с этим в искусственных условиях предприятий аквакультуры (преимущественно за рубежом

в странах Северного полушария) используются методы увеличения скорости роста лососевых видов рыб за счет удлинения светового дня [2–4]. Большинство исследований посвящены влиянию фотопериода на физиологические параметры рыб, однако недостаточно информации о биохимических механизмах регуляции метаболизма во время роста, стимулируемого светом. Фотопериод влияет на процессы регуляции роста, что приводит к изменению уровней экспрессии генов регуляторных и структурных белков, которые определяют скорость метаболизма и синтеза структурных и резервных веществ. Энергетический обмен — важнейший параметр, который может быть использован для оценки состояния отдельных особей и популяции в целом. Активный рост рыб, в особенности на стадии раннего онтогенеза, а также в первые годы жизни, обеспечивается высокоэнергетическими процессами биосинтеза [5]. Ранее, в наших исследованиях влияния фотопериода

Институт биологии — обособленное подразделение
Федерального исследовательского центра
“Карельский научный центр РАН”, Петрозаводск, Россия
*e-mail: kuznetsovamvi@yandex.ru

на искусственное выращивание молоди лосося в условиях северных широт (регион Белого моря) показано, что непрерывный свет (режим 24 свет:0 темнота) способствовал ускорению роста особей, что сопровождалось изменением аэробного и анаэробного обмена в мышцах [6].

В условиях климата Южного региона России есть возможность выращивания форели при температуре воды в диапазоне 8–18°C, в отсутствие зимних периодов низких температур, что позволяет рыбе питаться и расти круглый год. Введение дополнительного освещения в условиях Южного региона позволило бы ускорить темпы роста форели, обеспечивая повышение эффективности использования кормов и получение рыб необходимой товарной массы в более короткий период. Исходя из этого, был поставлен эксперимент по влиянию постоянного освещения на рост и развитие молоди радужной форели (0+) в условиях аквакультуры в южном регионе России (Республика Северная Осетия – Алания). Целью данной работы было изучение изменений в активности ферментов энергетического и углеводного обмена в мышцах и печени молоди форели в процессе роста и развития, при введении дополнительного освещения и кормления в ночное время суток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом данного исследования были двухлетки радужной форели (1+), выращиваемые в бассейнах на предприятии ООО “Остров аквакультура” в Северной Осетии – Алании. Исследовали влияние круглосуточного освещения на рост рыб. В начале сентября особей форели со средней массой 500 грамм разделили на две группы: контрольная группа (контроль) – режим освещения естественный, кормление в светлое время суток через каждые 2 ч; экспериментальная группа (опыт) – режим освещения постоянный (24С:0Т), кормление ночью, через каждые 2 ч. Бассейны с круглосуточным освещением были снабжены светодиодными LED лампами (36W, 6500K) по всему периметру вдоль стен, уровень освещенности составлял 700–800 lx под каждой лампой. Дополнительное освещение включали с наступлением сумерек. Условия естественного освещения: 10000–12000 lx – в сентябре и октябре, 6500 lx – в ноябре, в пасмурную погоду– 500 lx. В эксперименте использовали

коммерческий корм марки Scretting Nutra HP (Италия). Для исследования отбирали двухлеток в начале сентября (стартовая дата забора материала), октября и ноября; из каждой группы было взято по 10 особей. В азот фиксировали кусочки белых мышц, печень. Для лабораторных исследований отобраны средние по размерно-весовым характеристикам особи (табл. 1).

Активность ферментов энергетического и углеводного обмена в мышцах (цитохром с оксидаза (ЦО, КФ 1.9.3.1), лактатдегидрогеназа (ЛДГ, 1.1.1.27), альдолаза (КФ 4.1.2.13)) и печени (ЦО, ЛДГ, пируваткиназа (ПК, КФ 2.7.1.40), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ, 1.1.1.49), 1-глицерофосфатдегидрогеназа (1-ГФДГ, КФ 1.1.1.8), альдолаза) определяли индивидуально для каждой особи методом спектрофотометрии. Исследования проводили на микропланшетном ридере CLARIOSTAR (BMG Labtech) по общепринятым методикам [7–10]. Активность ферментов выражали в мкмоль субстрата (продукта)/мин/мг белка. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорд [11]. Статистический анализ полученных результатов проводили общепринятыми методами вариационной статистики с использованием критерия Шапиро–Уилкса, теста Краскела–Уоллиса с последующим сравнением выборок по критерию Манна–Уитни. Все результаты считались значимыми при $p < 0.05$. Все данные представлены как $M \pm SE$. Исследования выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования указывают на то, что при введении круглосуточного освещения радужная форель, выращиваемая в бассейнах рыбоводного хозяйства в условиях Северной Осетии – Алании, активно питается в ночное время, при этом имеет хорошие параметры роста и выживаемости. Удельная скорость роста была в выше при опытном ночном кормлении по сравнению с контролем (10.6 г/день против 9.03 гр/день за первый месяц, 11.9 г/день против 10.2 г/день за второй месяц ($p < 0.05$)).

Результаты исследования активности ферментов в печени особей радужной форели демонстрируют различия между группами с круглосуточным и естественным освещением (рис. 1). В качестве

Таблица 1. Средняя масса (г) и длина (см) молоди форели

Группа рыб	9 сентября		9 октября		10 ноября	
	масса	длина	масса	длина	масса	длина
Контроль	507.9±47.9	33.0±0.7	836.4±38.6	38.4±0.8	1370.0±74.4	43.5±1.0
Опыт	572.5±28.1	35.0±0.4	895.0±38.8	39.6±0.6	1335.0±61.4	44.2±0.9

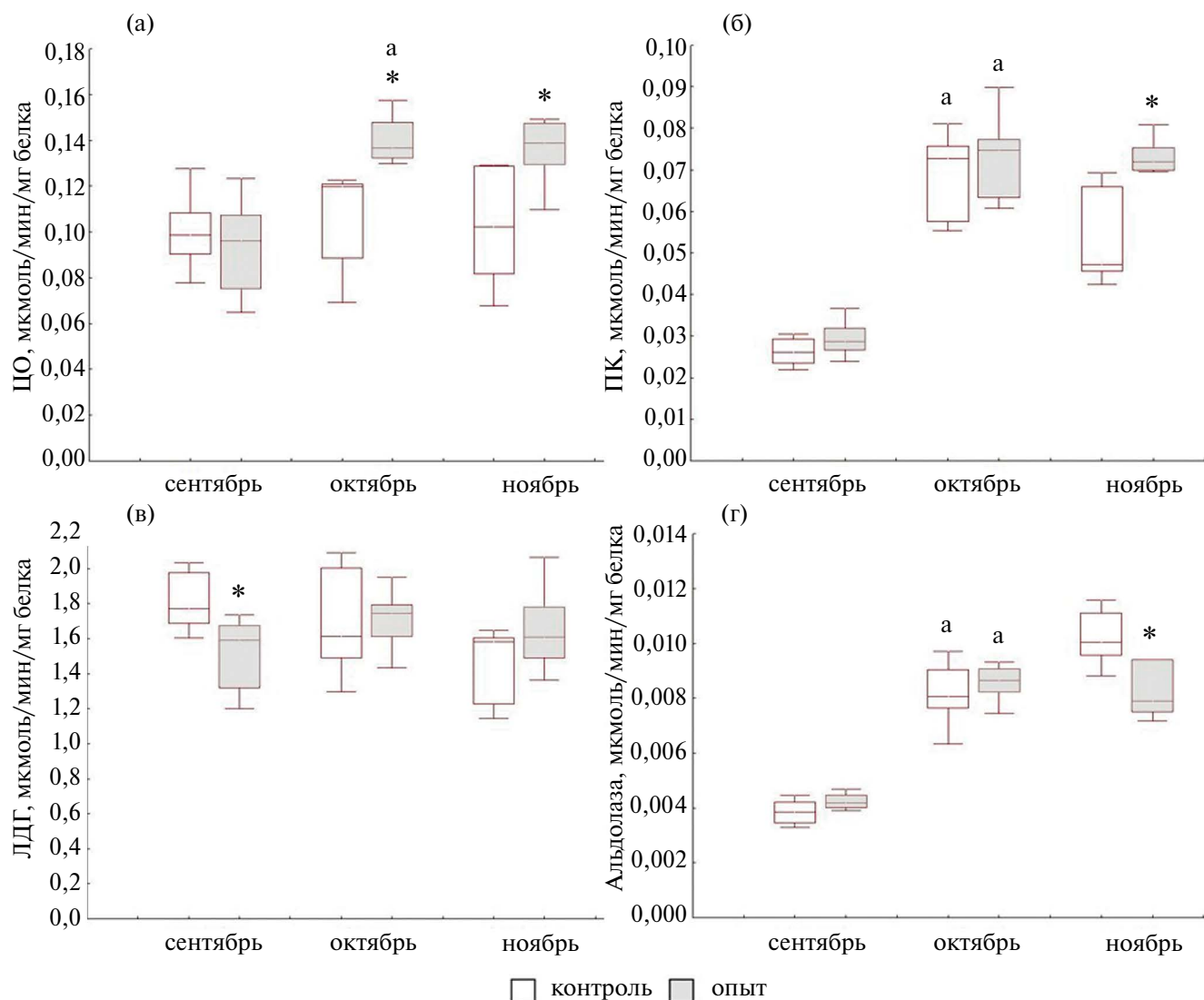


Рис. 1. Относительная активность ферментов (мкмоль/мин/мг белка) в печени особей радужной форели (1+) из контрольной группы (режим освещения естественный, кормление в светлое время суток) и экспериментальной группы (режим освещения постоянный, кормление ночью): а) ЦО, б) ПК, в) ЛДГ, г) альдолаза. Различия достоверны при $p < 0.05$: * — между контролем и опытом, а — в сравнении со значениями в предыдущем месяце в соответствующей группе.

показателя аэробного обмена использовали значение активности фермента дыхательной цепи митохондрий цитохром *c* оксидазы [12]. Согласно результатам, активность ЦО повышалась через месяц исследования в группе с круглосуточным освещением и была выше по отношению к группе с естественным освещением в течение дальнейшего эксперимента (рис. 1а). Эти данные свидетельствуют о более высоком уровне аэробного обмена в печени рыб из экспериментальной группы. Вероятно, что при включении дополнительного освещения и кормления рыб в ночное время создаются условия, благоприятно влияющие на состояние рыб и усвоение корма, в том числе

за счет более низких температур и стабильного уровня кислорода по сравнению с дневным временем суток. Имеются сведения о том, что высокий уровень аэробного обмена позволяет рыбам использовать энергию не только для поддержания основного обмена веществ и физической активности, но и в процессах биосинтеза структурных и резервных соединений, требующих большого количества АТФ [13]. Активность ПК в печени рыб из экспериментальной группы в ноябре была выше по сравнению с рыбами из контроля (рис. 1б). Значение активности пируваткиназы может использоваться как индикатор интенсивности образования пирувата, который используется в аэробном

синтезе АТФ, а также в качестве предшественника для синтеза жирных кислот [13]. Эти результаты (с учетом высокой активности ЦО) указывают на высокую интенсивность образования пирувата и его использование в аэробном синтезе АТФ. Согласно данным Метон с коллегами [13], уровень активности ПК в печени отражает условия кормления, в частности, он снижается во время голодания рыб. Возможно, ночное освещение выступает фактором, стимулирующим пищевую активность. Известно, что увеличение продолжительности светового дня вызывает повышение уровня гормона роста (соматотропина) у атлантического лосося [14], что, в свою очередь, повышает плавательную активность и аппетит рыб.

Круглосуточное освещение и перенос кормления на ночное время отражались на перераспределении субстратов, используемых в энергетическом обмене. По уровню активности альдолазы в печени различия между группами были установлены в ноябре (рис. 1г). Альдолаза катализирует образование дигидроксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата, которые впоследствии участвуют в процессах гликолиза, глюконеогенеза и образования липидов. Значения активности этого фермента у рыб в группе с круглосуточным освещением были ниже, что указывает на снижение интенсивности глюконеогенеза в печени [15].

Различий между группами особей форели в активности ферментов 1-ГФДГ и Г6ФДГ

в печени не обнаружено. Г6ФДГ является ключевым ферментом пентозофосфатного пути, в котором происходит образование пентоз и генерируется восстановитель в форме НАДФН, использующийся в реакциях биосинтеза жирных кислот, холестерина [16]. Роль 1-ГФДГ в печени связана главным образом с процессом синтеза глицерофосфата из углеводов, который используется для синтеза структурных и запасных липидов [17–18]. Таким образом, ночное освещение и изменение в режиме питания не повлияли на процессы связывающие пути распада глюкозы с другими процессами биосинтеза.

Закономерности, установленные в динамике активности ферментов в печени рыб показывают, что через месяц эксперимента уровень активности пируваткиназы, альдолазы и Г6ФДГ повышался как в экспериментальной группе, так и в контрольной (рис. 1б,в,г). Это свидетельствует об увеличении уровня использования углеводов в гликолизе и пентозофосфатном пути, что необходимо для осуществления процессов биосинтеза в процессе роста форели.

В мышцах молоди форели межгрупповых различий по активности ЦО не было выявлено (рис. 3а), но при этом в ноябре у рыб из группы с естественным освещением уровень активности ЦО снижался, в то время как при круглосуточном освещении оставался стабильным (рис. 3а). Это может свидетельствовать о поддержании уровня аэробного обмена в экспериментальной группе за счет влияния

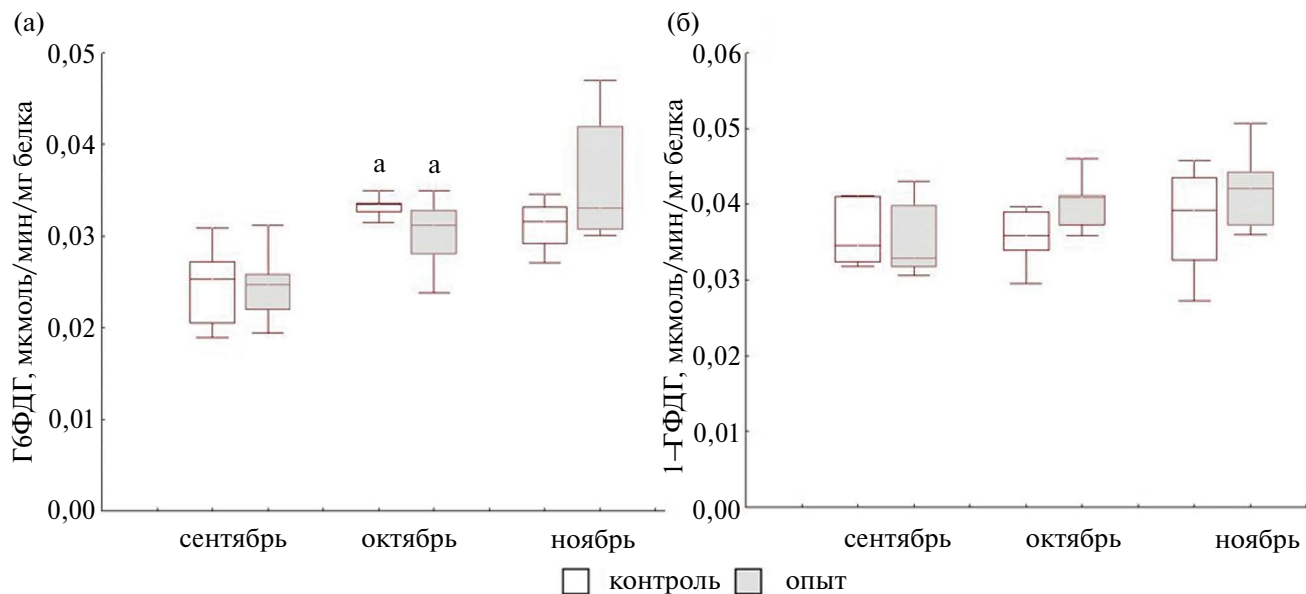


Рис. 2. Относительная активность ферментов (мкмоль/мин/мг белка) в печени особей радужной форели (1+) из контрольной группы (режим освещения естественный, кормление в светлое время суток) и экспериментальной группы (режим освещения постоянный, кормление ночью): а) Г6ФДГ, б) 1-ГФДГ. Различия достоверны при $p < 0.05$: а — в сравнении со значениями в предыдущем месяце в соответствующей группе.

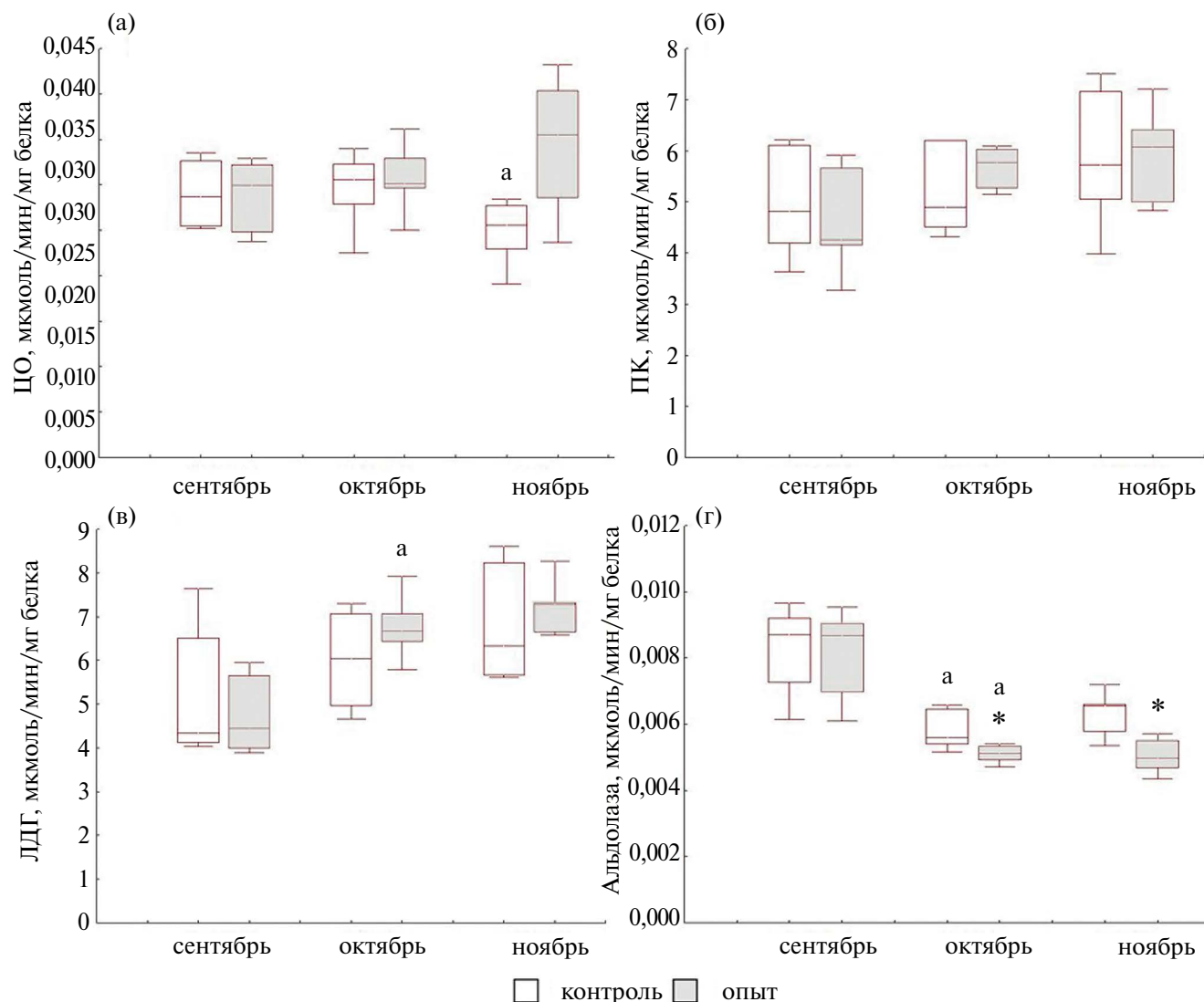


Рис. 3. Относительная активность ферментов (мкмоль/мин/мг белка) в белых мышцах особей радужной форели (1+) из контрольной группы (режим освещения естественный, кормление в светлое время суток) и экспериментальной группы (режим освещения постоянный, кормление ночью): а) ЦО, б) ПК, в) ЛДГ, г) альдолаза. Различия достоверны при $p < 0.05$: * – между контролем и опытом, а – в сравнении со значениями в предыдущем месяце в соответствующей группе.

света на кормовую активность и эффективность усвоения поступающих питательных веществ [1, 19].

Наблюдались различия в уровне активности альдолазы между исследуемыми группами в октябре и в ноябре (рис. 3г). Значения активности данного фермента у форели в группе с круглосуточным освещением были ниже, характеризую снижение уровня использования углеводов с целью энергообеспечения мышц в пользу других субстратов (Llewellyn et al., 1998).

Полученные результаты по влиянию дополнительного освещения и кормления ночью на состояние форели согласуются с данными нашего

исследования, проведенного на атлантическом лососе в условиях выращивания на предприятии в Северной Осетии. Согласно данным эксперимента [20] активность альдолазы в печени и мышцах была ниже, а активность пируваткиназы в печени выше у сеголеток лосося, выращиваемых при постоянном режиме освещения и круглосуточном кормлении. Можно предположить о наличии определенных закономерностей в перестройке метаболизма при введении круглосуточного освещения, заключающихся в перераспределении субстратов, используемых в энергетическом обмене.

Таким образом, результаты эксперимента указывают на то, что режим выращивания форели в условиях аквакультуры с круглосуточным освещением и ночным кормлением, когда наблюдаются более низкие температуры и стабильный уровень кислорода, благоприятно сказывается на состоянии рыб и способствует лучшему усвоению корма и приросту массы форели за счет метаболических перестроек в энергетическом и углеводном обмене. Полученные данные могут быть использованы для разработки научно-методического обоснования внедрения круглосуточного освещения и ночного кормления в технологию выращивания форели в экологических условиях Северной Осетии, что может способствовать повышению прироста выращиваемых рыб и, соответственно, увеличению выхода товарной продукции.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа финансировалась из средств федерального бюджета, выделенных на выполнение темы в рамках проекта Российского научного фонда № 23-24-00617. Работа выполнена с использованием научного оборудования ЦКП КарНЦ РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

“Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтического комитета ИБ КарНЦ РАН в протоколе № 11, 03 сентября 2024 года”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boeuf G., Falcon J., Photoperiod and growth in fish // *Vie Milieu*. 2002. Vol. 51. P. 237–246.
2. Noori A., Mojazi Amiri B., Mirvaghefi A., et al. Enhanced growth and retarded gonadal development of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) following a long-day photoperiod // *Aquac. Res.* 2015. Vol. 46. P. 2398–2406.
3. Lundova K., Matousek J., Prokesova M., et al. The effect of timing of extended photoperiod on growth and maturity of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) // *Aquac. Res.* 2019. Vol. 50, №6. P. 1697–1704.
4. Sonmez A.Y., Hisar O., Hisar S.A., et al. The effects of different photoperiod regimes on growth, feed conversion rate and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry // *J Anim Vet Adv.* 2009. Vol. 8. P. 760–763.
5. Озернюк Н.Д. Энергетический обмен в раннем онтогенезе рыб // М.: Наука. 1985. 175 с.
6. Churova M.V., Shulgina N., Kuritsyn A., et al. Muscle-specific gene expression and metabolic enzyme activities in Atlantic salmon *Salmo salar* L. fry reared under different photoperiod regimes // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2020. Vol. 239. P. 110330.
7. Smith L. Spectrophotometric assay of cytochrome c oxidase // *Methods in Biochem Analysis*. 1995. Vol. 2. P. 427–434.
8. Колб В.Г., Камышиников В.С. Клиническая биохимия // Минск: Изд-во Беларусь. 1976. 311 с.
9. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии // М.: Высш. шк. 1980. 272 с.
10. Bücher T., Pfeleiderer G. Pyruvate kinase from muscle // *Methods in Enzymology*. 1955. Vol. 1. P. 345–440.
11. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.
12. Gauthier C., Campbell P., Couture P. Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*) // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*. 2008. Vol. 151. P. 526–532.
13. Metón I., Mediavilla D., Caseras A., et al. Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis–gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) // *British J. Nutrition*. 1999. Vol. 82, №3. P. 223–232.
14. Björnsson B.T., Thorarensen H., Hirano T., et al. Photoperiod and temperature affect plasma growth hormone levels, growth, condition factor and hypoxia-regulatory ability of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) during parr-smolt transformation // *Aquaculture*. 1989. Vol. 82, №1–4. P. 77–91.
15. Llewellyn L., Sweeney G.E., Ramsurn V.P., et al. Cloning and unusual expression profile of the aldolase B gene from Atlantic salmon // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*. 1998. Vol. 1443(3). P. 375–380.
16. Tian W.N., Braunstein L.D., Pang J., et al. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 10609–10617.
17. Harmon J.S., Sheridan M.A. Glucose-stimulated lipolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver // *J. Fish Physiol. and Biochem.* 1992. Vol. 10. P. 189–199.
18. Treberg J.R., Lewis J.M., Driedzic W.R. Comparison of liver enzymes in osmerid fishes: key differences between a glycerol accumulating species, rainbow smelt (*Osmerus mordax*), and a species that does not accumulate glycerol, capelin (*Mallotus villosus*) // *Comp.*

- Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 2002. Vol. 132. P. 433–438.
19. Biswas A.K., Seoka M., Inoue Y., et al. Photoperiod influences the growth, food intake, feed efficiency and digestibility of red sea bream (*Pagrus major*) // Aquaculture. 2005. Vol. 250, №3–4. P. 666–673.
20. Kuznetsova M.V., Rodin M.A., Shulgina N.S., et al. The Influence of Different Lighting and Feeding Regimes on the Activity of Metabolic Enzymes in Farmed Atlantic Salmon Fingerlings // Russian Journal of Developmental Biology. 2023. T. 54, №2. C. 147–155.

ACTIVITY OF ENERGY AND CARBOHYDRATE METABOLISM ENZYMES IN RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS* WALB.) WITH THE INTRODUCTION OF 24-HOUR LIGHTING IN AQUACULTURE CONDITIONS OF THE SOUTHERN REGION OF THE RUSSIAN FEDERATION

M. A. Rodin, M. V. Kuznetsova*, M. Yu. Krupnova, A. E. Kuritsyn,
Academician of the RAS N. N. Nemova

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

**e-mail: kuznetsovamvi@yandex.ru*

The activity of energy and carbohydrate metabolism enzymes (cytochrome *c* oxidase, pyruvate kinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glycerophosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, aldolase) was studied in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walb. grown in aquaculture conditions at an enterprise in North Ossetia-Alania under a regime including 24-hour lighting and night feeding. According to the results of the study, the activity of cytochrome *c* oxidase and pyruvate kinase in the liver of fish from the experimental group was significantly higher than in the control individuals, indicating an increase in the aerobic metabolism level of ATP synthesis. The activity of aldolase in the organs of fish grown under 24-hour lighting was lower compared to fish from the control group, indicating a decrease in the level of carbohydrate utilization in glycolysis in muscles and the intensity of gluconeogenesis in the liver. The differences revealed suggest that with the introduction of 24-hour lighting and night feeding, metabolic changes are observed in energy and carbohydrate metabolism, facilitating biosynthesis processes and, accordingly, an increase in fish weight

Keywords: rainbow trout, energy metabolism, enzyme activity, photoperiod

УДК 571.27

СОЗДАНИЕ ПАНЕЛИ БИОМАРКЕРОВ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

© 2024 г. Л. А. Овчинникова¹, С. С. Джелад¹, Т. О. Симанив²,
М. Н. Захарова², Я. А. Ломакин^{1, *},
академик РАН А. Г. Габибов^{1, 3, **}, академик РАН С. Н. Иллариошкин²

Поступило 30.08.2024 г.

После доработки 10.09.2024 г.

Принято к публикации 10.09.2024 г.

Демиелинизирующие заболевания — группа гетерогенных патологий, поражающих нервную систему человека и существенно снижающих качество жизни. Одним из таких заболеваний является рассеянный склероз (РС) — воспалительное иммуноопосредованное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), приводящее к нейродегенерации. На начальных этапах РС может мимикрировать под некоторые инфекционные, неопластические, генетические, метаболические, сосудистые и другие патологии. Точная дифференциальная диагностика данного заболевания важна для улучшения качества жизни пациентов и снижения возможных необратимых поражений ЦНС. В данной работе мы подтвердили возможность использования предложенной нами ранее кандидатной панели биомаркеров РС для отличия РС от заболеваний спектра оптиконевромиелита (ЗСОНМ) и бокового амиотрофического склероза (БАС). Мы показали, что предложенная панель (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ + PRX₄₅₁₋₄₉₄ + РТК6₃₀₁₋₃₄₄ + LMP1₂₈₅₋₃₃₀) позволяет с высоким уровнем чувствительности отличить РС от БАС (AUC = 0,796) и ЗСОНМ (AUC = 0,779).

Ключевые слова: рассеянный склероз, РС, аутоантитела, вирус Эпштейна-Барр, демиелинизирующие заболевания

DOI: 10.31857/S2686738924060155

ВВЕДЕНИЕ

Демиелинизирующие заболевания ЦНС — гетерогенная группа патологий, общим признаком которых является поражение нервной ткани с вовлечением олигодендроцитов, приводящее к разнообразным неврологическим нарушениям. Зачастую специфическая для каждого отдельного заболевания симптоматика может появляться не сразу, затрудняя дифференциальную диагностику и откладывая начало терапии. Одним из таких заболеваний является рассеянный склероз (РС) — иммуноопосредованное заболевание центральной нервной

системы (ЦНС), при котором поражается миелиновая оболочка нервного волокна [1]. С течением времени данное заболевание неизбежно прогрессирует, что отражает частичный переход от преимущественно локализованного острого повреждения к распространенному воспалению и нейродегенерации в сочетании с недостаточностью компенсаторных механизмов, таких как нейропластичность и ремиелинизация [2]. Однако на начальных этапах симптомы РС возможно перепутать с проявлением некоторых инфекционных, неопластических, генетических, метаболических, сосудистых и других идиопатических воспалительных демиелинизирующих расстройств [3]. При этом диагностика РС может быть произведена по критериям МакДональда на основании МРТ уже после первого эпизода клинической атаки [4], когда воспалительное поражение миелиновой оболочки необратимо. К заболеваниям, для которых необходима дифференциальная диагностика с РС относятся заболевания спектра оптиконевромиелита (ЗСОНМ), ранее классифицируемые как варианты течения РС, однако нуждающиеся в принципиально иной терапии [5, 6]. При

¹Институт биоорганической химии
им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, 117997, Москва, Россия

²Научный центр неврологии, 125367, Москва, Россия

³Московский государственный университет
им. М.В.Ломоносова, 119234, Москва, Россия

*e-mail: yasha.l@bk.ru,

**e-mail: gabibov@gmail.com

ЗСОНМ очаги воспаления локализируются преимущественно по ходу зрительного нерва и спинного мозга. Данное заболевание также характеризуется наличием антител к аквапорино-4. К первично нейродегенеративным заболеваниям относится боковой амиотрофический склероз (БАС). Для данной патологии специфична симптоматика, связанная с поражением двигательных нейронов, расположенных как в моторной коре, так и в ядрах черепных нервов и передних рогах спинного мозга. Однако диагностика БАС зачастую вызывает сложности, особенно на ранних стадиях заболевания [7].

Ранее на основании уровня сывороточных антител к потенциальным мишеням аутоиммунной агрессии нами были предложены следующие кандидатные пептидные биомаркеры РС: (протеин-тирозин киназа 6 (PTK6₃₀₁₋₃₄₄), периаксин (PRX₄₅₁₋₄₉₄), альфа-II-спектрин (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄)). При добавлении к представленной панели дополнительного антигена — латентного мембранного белка 1 (LMP1)

вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) — наиболее вероятного триггера РС — диагностическая чувствительность данной панели увеличивается. Цель данного исследования — определить возможность использования предложенной панели антигенов на выборках пациентов с неврологическими заболеваниями, отличными от РС. Такая валидация позволит определить предсказательную ценность аутоантисгенных маркеров на основе титра антиген-специфичных аутореактивных антител у пациентов с РС, но не у пациентов с другими заболеваниями, для которых также характерно поражение ЦНС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение количества антиген-специфичных антител к исследуемым антигенам в сыворотках крови пациентов с РС (n=28), БАС (n=14), ЗСОНМ (n=5) проводилось методом иммуноферментного

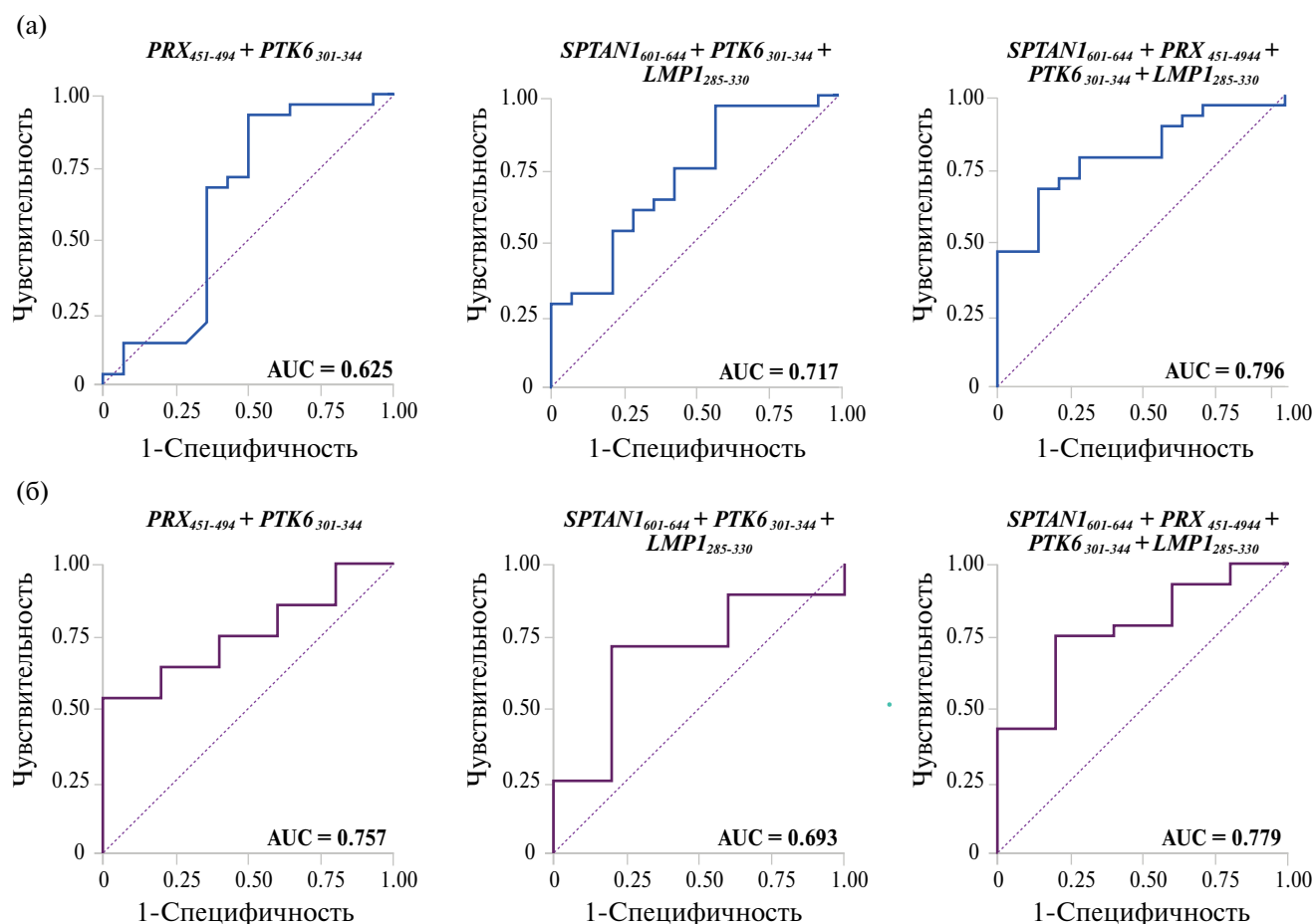


Рис 1. ROC-анализ подобранных комбинаций аутоантигенов и вирусного пептида вируса Эпштейна-Барр для дифференциальной диагностики РС от других нейродегенеративных заболеваний. А — ROC-кривые, полученные при сравнении эффективности кандидатных панелей для дифференциальной диагностики РС и бокового амиотрофического склероза (БАС). Б — ROC-кривые, полученные при сравнении эффективности кандидатных панелей для дифференциальной диагностики рассеянного склероза и заболеваний спектра оптиконевромиелита (ЗСОНМ). AUC (от англ. Area Under Curve) — площадь под кривой.

Таблица 1. Показатели, полученные по результатам ROC-анализа для различных комбинаций аутоантигенов и вирусного пептида LMP1

Группы сравнения	Комбинация биомаркеров	AUC	ACC	SE	SP
РС и БАС	PRX ₄₅₁₋₄₉₄ PTK6 ₃₀₁₋₃₄₄	0.625	0.786	0.929	0.500
	SPTAN1 ₆₀₁₋₆₄₄ PTK6 ₃₀₁₋₃₄₄ LMP1 ₂₈₅₋₃₃₀	0.717	0.786	0.964	0.429
	SPTAN1 ₆₀₁₋₆₄₄ PRX ₄₅₁₋₄₉₄ PTK6 ₃₀₁₋₃₄₄ LMP1 ₂₈₅₋₃₃₀	0.796	0.738	0.679	0.857
РС и ЗСНОМ	PRX ₄₅₁₋₄₉₄ PTK6 ₃₀₁₋₃₄₄	0,757	0.606	0.536	1
	SPTAN1 ₆₀₁₋₆₄₄ PTK6 ₃₀₁₋₃₄₄ LMP1 ₂₈₅₋₃₃₀	0.693	0.727	0.714	0.800
	SPTAN1 ₆₀₁₋₆₄₄ PRX ₄₅₁₋₄₉₄ PTK6 ₃₀₁₋₃₄₄ LMP1 ₂₈₅₋₃₃₀	0.779	0.758	0.750	0.800

Примечание. РС – рассеянный склероз; БАС – боковой амиотрофический склероз; ЗСНОМ – заболевание спектра оптиконевромиелита; AUC (от англ. Area Under Curve) – площадь под кривой; ACC – диагностическая точность; SE – чувствительность; SP – специфичность.

анализа (ИФА). Для каждого пациента проводили по три измерения.

Для определения диагностической точности оптимальных комбинаций уровней аутореактивных IgG в сыворотке крови использовался метод анализа CombiROC [8]. Лучшие комбинации биомаркеров были определены путем анализа кривых рабочих характеристик приемника (ROC), расчета чувствительности (SE) и специфичности (SP) всех возможных комбинаций маркеров (<http://CombiROC.eu>). Для оценки достоверности полученных значений был произведен пермутационный тест.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Для создания эффективной панели кандидатных биомаркеров мы подобрали следующие комбинации пептидных мишеней: (1) PRX₄₅₁₋₄₉₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄; (2) SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄ + LMP1₂₈₅₋₃₃₀; (3) SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ + PRX₄₅₁₋₄₉₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄ + LMP1₂₈₅₋₃₃₀. Данные аутоантигенные и вирусные пептиды были использованы для определения уровня специфических антител среди тотального пула IgG периферической крови пациентов с РС, ЗСНОМ и БАС. По результатам данного анализа были построены ROC-кривые, характеризующие точность используемой панели аутоантигенов для дифференциальной диагностики перечисленных нейродегенеративных заболеваний (рис. 1). Характеристики, полученные для данных ROC-кривых, представлены в табл. 1. Из полученных данных видно, что

использование двух (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄) или трех (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ + PRX₄₅₁₋₄₉₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄) аутоантигенов в сочетании с вирусным белком (LMP1₂₈₅₋₃₃₀) позволяют дифференцировать РС от БАС (AUC > 0,7; рис. 1А). В свою очередь, для отличия РС от ЗСНОМ возможно использование панели двух аутоантигенов без добавления вирусного пептида (PRX₄₅₁₋₄₉₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄) или всех четырех антигенов (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ + PRX₄₅₁₋₄₉₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄ + LMP1₂₈₅₋₃₃₀) (рис. 1Б). При этом наибольшее значение площади под кривой (AUC), характеризующее большую точность распознавания, было получено для панели, содержащей все 4 биомаркера (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ + PRX₄₅₁₋₄₉₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄ + LMP1₂₈₅₋₃₃₀) как в случае распознавания РС и БАС (AUC=0,796), так и в случае распознавания РС и ЗСНОМ (AUC=0,779).

Далее для более надежной оценки достоверности полученных результатов и подтверждения эффективности предлагаемых панелей потенциальных маркеров РС мы провели статистический тест с перемешиванием полученных значений титров антиген-специфичных антител для каждого донора (Рис. 2). Этот статистический критерий предполагает многократное случайное перераспределение набора наблюдаемых данных для более точной оценки достоверности полученного результата. По результатам данного теста полученные значения AUC для наиболее эффективной панели (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ + PRX₄₅₁₋₄₉₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄ + LMP1₂₈₅₋₃₃₀) радикально отличаются от значений для перераспределенных образцов, что указывает на возможность дальнейшего применения предложенной кандидатной панели четырех биомаркеров РС. При

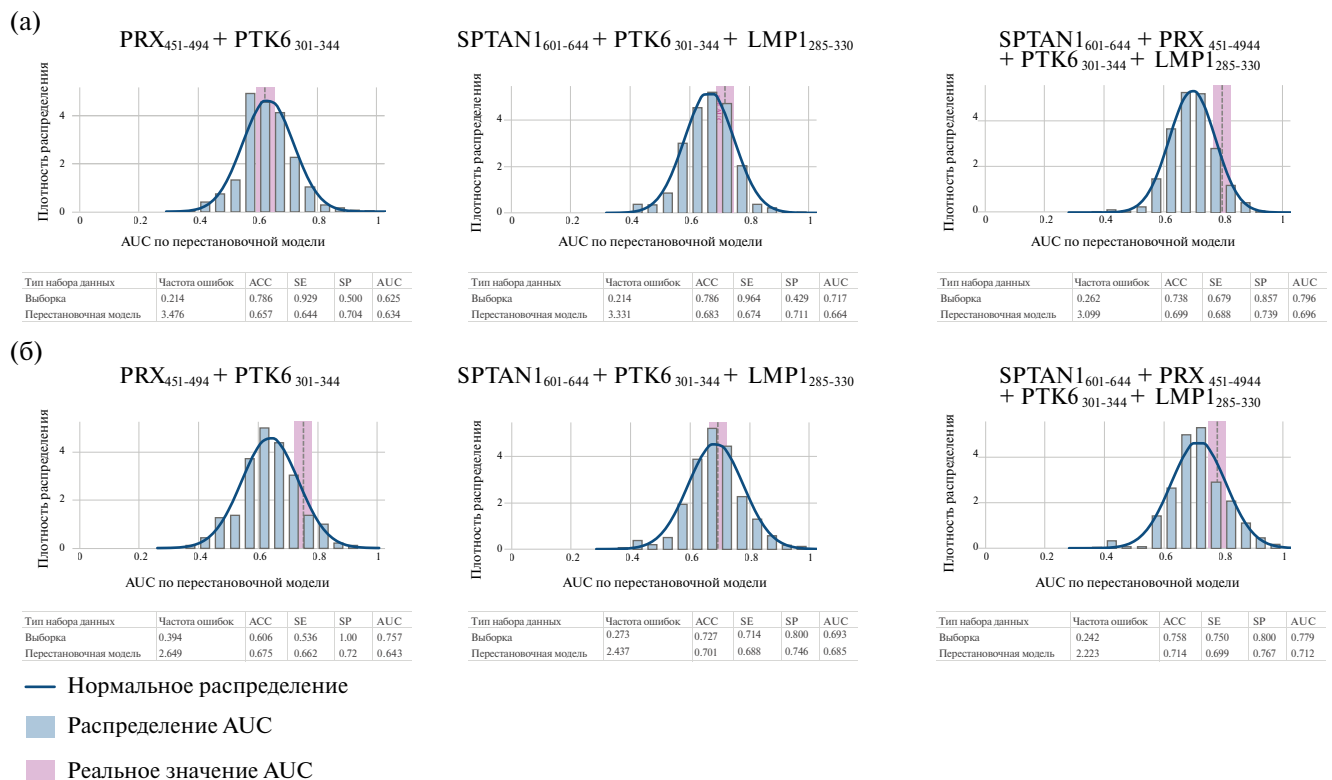


Рис. 2. Пермутационный тест (тест на перестановку). А — Различие РС от БАС (бокового амиотрофического склероза). Б — Различие рассеянного склероза от ЗСНОМ (заболеваний спектра оптиконевромиелита). AUC (от англ. Area Under Curve) — площадь под кривой; ACC — диагностическая точность; SE — чувствительность; SP — специфичность.

этом видно, что в случае использования только двух (PRX₄₅₁₋₄₉₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄) или трех (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄ + LMP1₂₈₅₋₃₃₀) маркеров, полученные значения AUC не являются достоверными, так как они значимо не отличаются от значений AUC при случайном распределении набора данных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

РС является крайне гетерогенным заболеванием, которое на сегодняшний день достоверно возможно диагностировать только после первого эпизода клинической атаки. Но даже после такого эпизода симптоматические проявления РС часто бывают схожи с другими неврологическими заболеваниями. Предложенная нами кандидатная панель биомаркеров (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ + PRX₄₅₁₋₄₉₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄ + LMP1₂₈₅₋₃₃₀) позволяет дифференцировать РС от других исследованных заболеваний (AUC=0.796 для БАС и AUC=0.779 для ЗСНОМ), что свидетельствует о ее высоком потенциале по отношению к РС. Тем не менее диагностическая ценность обнаруженных антигенов требует дальнейших исследований, и мы надеемся, что идентифицированные пептиды смогут стать удобным,

экономически эффективным и значимым серологическим биомаркером для диагностики рассеянного склероза. Мы ожидаем, что дальнейшие продолжительные исследования, включая анализ спинномозговой жидкости, подтвердят наши выводы и помогут установить роль выявленных антигенов в патогенезе рассеянного склероза.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ No 22-14-00219.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования с клиническими образцами проводились в соответствии с рекомендациями,

изложенными в Хельсинкской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Научного центра неврологии. У всех пациентов, включенных в исследование, было получено письменное согласие. Все клинические образцы были использованы в работе после их деидентификации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lomakin Y.A. u др.* Deconvolution of B cell receptor repertoire in multiple sclerosis patients revealed a delay in tBreg maturation. // *Front. Immunol.* 2022. T. 13. C. 803229.
2. *Kuhlmann T. u др.* Multiple sclerosis progression: time for a new mechanism-driven framework. // *Lancet Neurol.* 2023. T. 22. № 1. C. 78–88.
3. *Ömerhoca S., Akkaş S.Y., İçen N.K.* Multiple sclerosis: diagnosis and differential diagnosis. // *Arch Neuropsychiatr.* 2018. T. 55. № Suppl 1. C. S1–S9.
4. *Thompson A.J. u др.* Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. // *Lancet Neurol.* 2018. T. 17. № 2. C. 162–173.
5. *Seok J.M. u др.* Differentiation between multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder using a deep learning model. // *Sci. Rep.* 2023. T. 13. № 1. C. 11625.
6. *Wingerchuk D.M. u др.* International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. // *Neurology.* 2015. T. 85. № 2. C. 177–189.
7. *Feldman E.L. u др.* Amyotrophic lateral sclerosis. // *Lancet.* 2022. T. 400. № 10360. C. 1363–1380.
8. *Mazzara S. u др.* CombiROC: an interactive web tool for selecting accurate marker combinations of omics data. // *Sci Rep.* 2017. T. 7. C. 45477.

DEVELOPMENT OF A PANEL OF BIOMARKERS FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF MULTIPLE SCLEROSIS

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

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

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

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

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

^{**}*E-mail: gabibov@gmail.com*

Academician of the RAS AG Gabibov
Academician of the RAS SN Illarionov

Demyelinating diseases are a group of heterogeneous pathologies that affect the nervous system and reduce the quality of life. One such disease is multiple sclerosis (MS), an inflammatory autoimmune neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS). At the initial stages, MS can mimic some infectious, neoplastic, genetic, metabolic, vascular and other pathologies. Accurate differential diagnosis of this disease is important to improve the quality of life of patients and reduce possible irreversible damage to the central nervous system. In this work, we confirmed the possibility of using our previously proposed candidate panel of MS biomarkers to distinguish MS from neuromyelitis optica spectrum diseases (NMOSD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). We have shown that our proposed panel (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ + PRX₄₅₁₋₄₉₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄ + LMP1₂₈₅₋₃₃₀) allows us to distinguish MS from ALS (AUC = 0,796) and NMOSD (AUC = 0,779).

Keywords: Multiple sclerosis, MS, autoantibodies, EBV, Epstein-Barr virus, Demyelinating diseases