



ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ



НАУКА
— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 517, 2024

Крыланы (Pteropodidae, Chiroptera) из плейстоцена Вьетнама <i>А. В. Лопатин</i>	5
Находки черепов ювенильных особей <i>Kurdalagonus taicopicus</i> (Cetacea, Cetotheriidae) в верхнем миоцене Республики Адыгея <i>К. К. Тарасенко</i>	15
Фауна и ландшафты Южно-Минусинской впадины (юг Сибири) в конце позднего плейстоцена <i>Д. Г. Маликов</i>	20
Волосяной покров водяного оленя <i>Hydropotes inermis</i> (Cervidae, Artiodactyla) – нового вида в фауне России <i>О. Ф. Чернова, Е. М. Щелканов</i>	27
Первая находка подоцитов в кровеносной системе загадочных червей – Эхиурид (Annelida: Thalassematidae) <i>П. А. Кузнецов, А. В. Ересковский, Е. Н. Темерева</i>	35
Полный митохондриальный геном <i>Clupeonella abrau</i> (Maliatsky, 1930) (Clupeiformes) – эндемичного вида пресноводных рыб из озера Абрау (Россия) <i>Д. П. Карабанов, Д. Д. Перебоев, Б. Д. Ефейкин, Ю. В. Кодухова, А. А. Котов</i>	39
Растения разных семейств однодольных различаются по содержанию азота и фосфора в листьях <i>А. А. Бетехтина, Н. А. Реутова, Д. В. Веселкин</i>	46
Комбинированный эффект базовых противогерпетических препаратов с новым ингибитором терминазного комплекса вируса простого герпеса 1-го типа в культуре клеток VeroE6 <i>В. Л. Андропова, Г. А. Галегов, О. А. Воздвиженская, Г. Л. Левит, В. П. Краснов, В. Н. Чарушин</i>	51
Содержание и поведение кишечногодышащего <i>Saccoglossus mereschkowskii</i> (Hemichordata, Enteropneusta) в лабораторных условиях <i>А. И. Лукиных, О. В. Ежова, Д. А. Клочихина, О. М. Катанова, В. В. Малахов</i>	56
Влияние взаимодействий между Su(Hw)-зависимыми инсуляторами на эффект трансекции у <i>Drosophila melanogaster</i> <i>Л. С. Мельникова, В. В. Молодина, П. Г. Георгиев, А. К. Головин</i>	61
Анализ естественных антител при развитии фантомного болевого синдрома <i>М. А. Мягкова, С. Н. Петроченко, З. В. Боброва, Е. А. Орлова</i>	69

Гомеотические гены *DUX4* образуют динамичные контакты с ядрышками в клетках человека

Е. С. Клушевская, И. Р. Алембеков, Ю. В. Кравацкий, Н. А. Чуриков

76

Индукция пути PERK-eIF2 α -ATF4 в M1 макрофагах при стрессе эндоплазматического ретикулума

О. Е. Колодеева, Д. А. Аверинская, Ю. А. Макарова, О. Е. Колодеева

81

CONTENTS

Vol. 517, 2024

Old World Fruit Bats (Pteropodidae, Chiroptera) from the Pleistocene of Vietnam <i>A. V. Lopatin</i>	5
Finds of Skulls of Juvenile <i>Kurdalagonus Maicopicus</i> (Cetacea, Cetotheriidae) in the Upper Miocene of the Republic of Adygea <i>K.K. Tarasenko</i>	15
Fauna and Landscapes of the Southern Minusinsk Basin (Southern Siberia) at the End of the Late Pleistocene <i>D.G. Malikov</i>	20
Hair Coat of the Water Deer <i>Hydropotes Inermis</i> (Cervidae, Artiodactyla) – a New Species in the Fauna of Russia <i>O. F. Chernova, E. M. Shchelkanov</i>	27
First Discovery of the Podocytes in the Circulatory System of Enigmatic Echiurids (Annelida: Thalassematidae) <i>P. A. Kuznetsov, A. V. Ereskovsky, E. N. Temereva</i>	35
Complete mitochondrial genome of <i>Clupeonella abrau</i> (Maliatsky, 1930) (Clupeiformes), an endemic species of freshwater fish from Lake Abrau (Russia) <i>D. P. Karabanov, D. D. Pereboev, B. D. Efeykin, Y. V. Kodukhova, A. A. Kotov</i>	39
Plants of Various Monocot Families Differ in Nitrogen and Phosphorus Content in Leaves <i>A. A. Betekhtina, N. A. Reutova, D. V. Veselkin</i>	46
Combined effect of base antiherpetic drugs with a new inhibitor of the terminase complex of herpes simplex virus type 1 in Vero cell culture <i>V. L. Andronova, G. A. Galegov, O. A. Vozdvizhenskaya, G. L. Levit, V. P. Krasnov, V. N. Charushin</i>	51
Keeping and Behaviour of an Acorn Worm <i>Saccoglossus Mereschkowskii</i> (Hemichordata, Enteropneusta) in Laboratory Conditions <i>A. I. Lukinykh, O. V. Ezhova, D. A. Klochikhina, O. M. Katanova, V. V. Malakhov</i>	56
Impact of interactions between Su(Hw)-dependent insulators on the transvection effect in <i>Drosophila melanogaster</i> <i>L. S. Melnikova, V. V. Molodina, P. G. Georgiev, A. K. Golovnin</i>	61
Analysis of natural antibodies during the development of phantom pain syndrome <i>M. A. Myagkova, S. N. Petrochenko, Z. V. Bobrova, E. A. Orlova</i>	69

Homeotic *DUX4* genes shape dynamic inter-chromosomal contacts with nucleoli in human cells

E. S. Klushevskaya, I. R. Alembekov, Y. V. Kravatsky, N. A. Tchurikov

76

Induction of the PERK-eIF2 α -ATF4 Pathway in M1 Macrophages under Endoplasmic Reticulum Stress

O. E. Kolodeeva, D. A. Averinskaya, Yu. A. Makarova, O. E. Kolodeeva

81

УДК 569.41:551.793(597)

КРЫЛАНЫ (PTEROPODIDAE, CHIROPTERA) ИЗ ПЛЕЙСТОЦЕНА ВЬЕТНАМА

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

Поступило 17.04.2024 г.

После доработки 24.04.2024 г.

Принято к публикации 24.04.2024 г.

Из среднеплейстоценового пещерного местонахождения Там-Хай в северном Вьетнаме (провинция Лангшон) описаны изолированные зубы малайского короткомордого крылана *Cynopterus brachyotis* (Müller, 1838), летучей собаки Лешенолта *Rousettus leschenaultii* (Desmarest, 1820) и пещерного крылана *Eonycteris spelaea* (Dobson, 1871). Это первые ископаемые находки крыланов во Вьетнаме. Среднеплейстоценовая ассоциация Pteropodidae из местонахождения Там-Хай может в основном отражать состав видов, селившихся в местных пещерах.

Ключевые слова: *Cynopterus brachyotis*, *Rousettus leschenaultii*, *Eonycteris spelaea*, крылановые, Pteropodidae, Chiroptera, средний плейстоцен, Вьетнам, Лангшон

DOI: 10.31857/S2686738924040015

Фруктоядные и нектароядные рукокрылые семейства крылановых (Pteropodidae) весьма многочисленны и разнообразны в тропических областях Азии и Африки, а также в Австралии и на многих островах Индийского и Тихого океанов. Семейство включает около 200 современных видов, группируемых в 45 родов, 14 триб и восемь подсемейств [1, 2].

Палеонтологическая летопись группы крайне скудна и отрывочна, особенно для палеогена и неогена [1, 3–6]. Из современных родов в ископаемом состоянии известны только шесть (исключая голоцен): *Eidolon*, *Micropteropus* и *Rousettus* с плиоцена, а *Cynopterus*, *Eonycteris* и *Pteropus* — с плейстоцена [3, 5, 6]. В связи с этим значительного внимания заслуживают остатки крылановых из среднеплейстоценового пещерного местонахождения Там-Хай (северный Вьетнам, провинция Лангшон, уезд Биньзя), собранные экспедиционным отрядом Палеонтологического института им. А.А. Борисяка РАН (ПИН) в 2021 и 2023 гг.

Пещера Там-Хай (Thảm Hai, Tham Hai) входит в пещерный комплекс Там-Кхюиен (Thảm Khuỷen), датированный средним плейстоценом (Там-Хай — 300–200 тыс. лет, 250 тыс. лет; Там-Кхюиен — 475 ± 125 тыс. лет) [7, 8]. В сборах из местонахождения Там-Хай обильно представлены

остатки мелких млекопитающих, включая насекомоядных, рукокрылых и грызунов [9].

В настоящее время во Вьетнаме обитает 13 видов крылановых, однако в северной части страны встречаются только девять: *Cynopterus brachyotis* (Müller, 1838), *C. sphinx* (Vahl, 1797), *Sphaerias blanfordi* (Thomas, 1891), *Rousettus amplexicaudatus* (Geoffroy, 1810), *R. leschenaultii* (Desmarest, 1820), *Megaerops niphanae* Yenbutra et Felten, 1983, *Eonycteris spelaea* (Dobson, 1871), *Macroglossus minimus* (Geoffroy, 1810) и *M. sobrinus* Andersen, 1911 [1, 10, 11]. В среднеплейстоценовом местонахождении Там-Хай обнаружены охарактеризованные ниже изолированные зубы малайского короткомордого крылана *C. brachyotis*, летучей собаки Лешенолта *R. leschenaultii* и пещерного крылана *E. spelaea*, а также остатки плохой сохранности, определенные как Pteropodidae indet.

Описанный материал хранится в коллекции ПИН, Москва. Для сравнительного изучения использовались черепа современных крылановых из коллекции Зоологического музея Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (ЗММУ). Изображения подготовлены с помощью сканирующего электронного микроскопа Tescan Vega 3 XMU в ПИН.

Номенклатура и терминология строения зубов Pteropodidae даны по [12], с изменениями (рис. 1). В связи с особенностями пищи (преимущественно мягкие фрукты, пыльца и нектар цветов) щечные зубы крылановых существенно модифицированы

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

*e-mail: alop@paleo.ru

по сравнению с зубами других рукокрылых. Упрощение структуры жевательной поверхности привело к образованию внешне похожих друг на друга уплощенных зубов с продольной срединной впадиной, обрамленной краевыми гребнями и (или) бугорками (лабиальный всегда выше лингвального, особенно в передней части) [13].

Видовую синонимику см. [13], подвидовой состав см. [1].

Отряд Chiroptera Blumenbach, 1779
Семейство Pteropodidae Gray, 1821
Подсемейство Synopterinae Gray, 1866
Триба Synopterini Gray, 1866
Род *Cynopterus* Cuvier, 1824
Cynopterus brachyotis (Müller, 1838)

Pachysoma brachyotis: [14], с. 146.

Синтипы — Нидерландский центр биоразнообразия «Натуралис» (ранее Национальный музей естественной истории), Лейден; четыре монтированных экземпляра, Cat. Syst. a–d (два взрослых самца, одна взрослая самка, одна молодая особь) и шесть черепов, Cat. Ost. b–g [13]; Индонезия, юг Центрального Калимантана (Dewej River; = Dewei, Dewai); современные.

Описание (рис. 2). В материале представлены щечные зубы P^3 , P^4 , P_1 , P_3 и M_2 (зубная формула — $I^1I^2C^1P^1P^3P^4M^1/I_1I_2C_1P_1P_3P_4M_1M_2$). Щечные зубы бугорчатые или плосковершинные, овальных очертаний, наиболее значительно возвышается крупный лабиальный (латеральный) бугорок, его высота уменьшается от P^3/P_3 к задним зубам. Эмаль на лабиальной стороне коронок обычно частично разрушена или скелета.

На P^3 и P^4 в передней части коронки имеются два супротивно расположенных главных бугорка — высокий и крупный лабиальный бугорок и сравнительно более мелкий лингвальный (медиальный, палатальный). Эти бугорки сращены основаниями, а их вершины связаны тонким, но хорошо развитым поперечным гребнем — комиссурой (commisure). Передняя сторона лабиального бугорка заметно выступает мезиально. Вершина лингвального бугорка располагается дистальнее уровня вершины лабиального бугорка. На передней стороне лингвального бугорка имеется четкий субвертикальный килевидный гребень. Общая задняя сторона главных бугорков прямая, довольно крутая. По боковым краям окклюзионной поверхности главные бугорки продлеваются назад тонкими продольными гребнями. Задний базальный выступ (posterobasal ledge) короткий, слабо углубленный в центральной части и ограниченный сзади узким и низким краевым гребнем.

Передняя сторона P^3 узкая. В основании передней стороны лингвального бугорка имеется узкий, но четкий полкообразный антеролингвальный выступ, медиально ограниченный килевидным

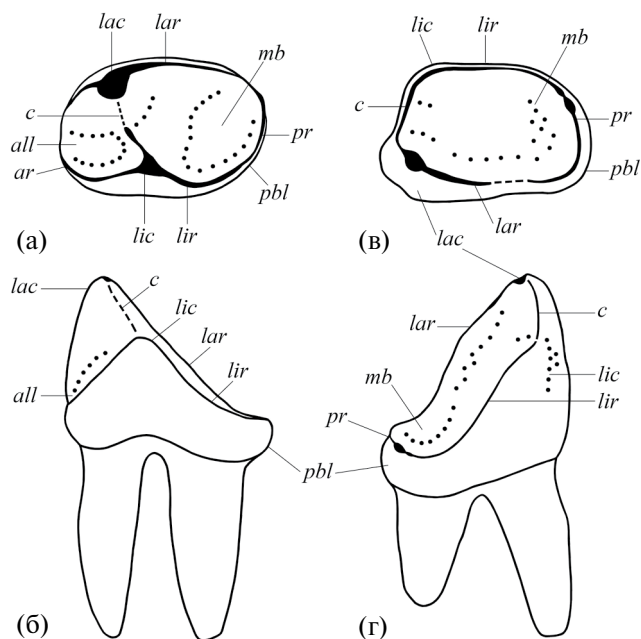


Рис. 1. Терминология элементов строения щечных зубов Pteropodidae на примере премоляров *Cynopterus brachyotis* (Müller, 1838): а, б — левый P^4 (по экз. ПИН, № 5826/571); в, г — левый P_3 (по экз. ПИН, № 5826/573); а, в — с окклюзионной стороны; б, г — с лингвальной стороны. Обозначения: all — антеролингвальный выступ; ar — передний гребень; c — комиссура (поперечный гребень); lac — лабиальный бугорок; lar — лабиальный гребень; lic — лингвальный бугорок; lir — лингвальный гребень; mb — срединный бассейн (срединная впадина); pbl — задний базальный выступ; pr — задний гребень.

передним гребнем, а латерально — передним выступом лабиального бугорка (рис. 2а, 2б). Лабиальный бугорок конический, с довольно крутым задним склоном (рис. 2в, 2г). Лингвальный бугорок сжат продольно. Задний базальный выступ сужается к дистальному краю. Корни относительно длинные, широко расставленные, расходящиеся; изогнутый передний корень немного длиннее, но тоньше заднего.

Передняя сторона у P^4 более широкая, чем у P^3 . Полкообразный антеролингвальный выступ на P^4 значительно крупнее, чем на P^3 , и образует довольно широкую площадку (рис. 2д–2ж). Килевидный передний гребень длинный. Лабиальный бугорок сильно сжат поперечно. Задний склон лабиального бугорка на P^4 более пологий, чем на P^3 (рис. 2з, 2и). Эмаль в этой части зуба отчетливо морщинистая (рис. 2д, 2е). Лингвальный бугорок треугольных очертаний. Задний базальный выступ крупный и относительно широкий. Корни одинаково длинные, прямые, сближенные в основании, параллельные; передний корень заметно тоньше заднего.

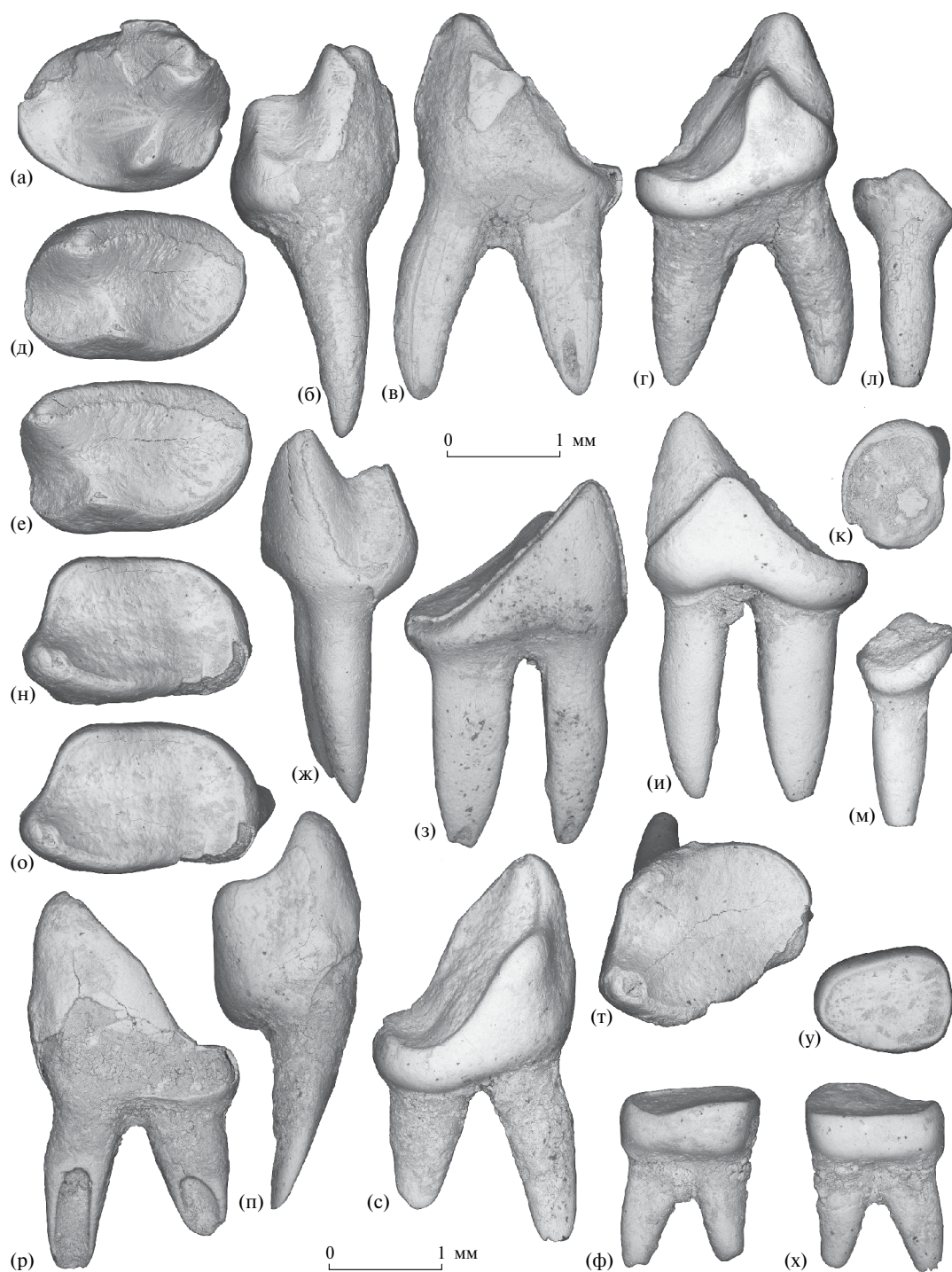


Рис. 2. *Cynopterus brachyotis* (Müller, 1838): а–г – экз. ПИН, № 5826/570, правый P^3 : а – с окклюзиальной стороны, б – с передней стороны, в – с лабиальной стороны, г – с лингвальной стороны; д–и – экз. ПИН, № 5826/571, левый P^4 : д – с окклюзиальной стороны, е – с окклюзиальной стороны с мезиальным наклоном, ж – с передней стороны, з – с лабиальной стороны, и – с лингвальной стороны; к–м – экз. ПИН, № 5826/572, левый P_1 : к – с окклюзиальной стороны, л – с лабиальной стороны, м – с лингвальной стороны; н–с – экз. ПИН, № 5826/573, левый P_3 : н – с окклюзиальной стороны, о – с окклюзиальной стороны с мезиальным наклоном, п – с передней стороны, р – с лабиальной стороны, с – с лингвальной стороны; т – экз. ПИН, № 5826/574, левый P_3 с окклюзиальной стороны; у–х – экз. ПИН, № 5826/505, правый M_2 : у – с окклюзиальной стороны, ф – с лабиальной стороны, х – с лингвальной стороны; Вьетнам, провинция Лангшон, пещера Там-Хай; средний плейстоцен.

P₁ маленький, однокорневой, с плоской овальной коронкой (рис. 2к). Антеролабиальная часть окклюзиальной поверхности с небольшим слегка возвышающимся бугорком (рис. 2л, 2м). Корень относительно длинный и широкий.

P₃ высокий, по строению принципиально сходен с P³ и P⁴, но отличается от них почти полностью сросшимися главными бугорками и гребневидной формой вершины лингвального бугорка. Передняя сторона коронки без выступа (рис. 2н–2п, 2т). Лабиальный бугорок высокий и массивный, лингвальный бугорок редуцированный (рис. 2п–2с). Задний базальный выступ короткий, срединный бассейн лишь слегка углубленный. Дистальный край заднего базального выступа сравнительно широкий, с отчетливым краевым гребнем. Корни умеренно длинные, изогнутые, широко разнесены в основании; задний корень существенно короче переднего.

M₂ мелкий, двухкорневой, с низкой плосковерхшинной коронкой округло-треугольной формы. Передний край окклюзиальной поверхности широкий, прямой, задний заметно сужен (рис. 2у). В антеролабиальном углу развит небольшой низкий бугорок (рис. 2ф, 2х). Остальная часть окклюзиальной поверхности слегка вогнутая, с низким краевым гребнем по периметру. Корни короткие, относительно толстые, сросшиеся в основании.

Размеры, в мм (L – длина; W – ширина): P³: L – 2.05; W – 1.65 (экз. ПИН, № 5826/570); P⁴: L – 2.1;

W – 1.4 (экз. ПИН, № 5826/820); L – 2.15 (экз. ПИН, № 5826/504); L – 2.2; W – 1.4 (экз. ПИН, № 5826/571); P₁: L – 1.0; W – 1.25 (экз. ПИН, № 5826/572); P₃: L – 2.1; W – 1.45 (экз. ПИН, № 5826/573); L – 2.1 (экз. ПИН, № 5826/574); M₂: L – 1.35; W – 1.0 (экз. ПИН, № 5826/505).

Сравнение. Описанные зубы *Cynopterus* из пещеры Там-Хай по строению и размерам соответствуют таковым современного *C. brachyotis* (табл. 1). Они существенно уступают по величине зубам *C. sphinx* (Vahl, 1797), *C. horsfieldii* Gray, 1843 и *C. titthaecheilus* (Temminck, 1825), но при этом превосходят таковые *C. minutus* Miller, 1906 (см. [13, 15]). От *C. nusatenggara* Kitchener et Maharadatunkamsi, 1991 и *C. luzoniensis* (Peters, 1861) форма из пещеры Там-Хай отличается хорошо развитым поперечным гребнем между передними бугорками на P⁴.

Замечания. В настоящее время выделяется семь подвидов *C. brachyotis* [1]. Данные по морфологической и генетической дифференциации некоторых популяций пока не получили таксономической оценки [16, 17]. Во Вьетнаме распространен подвид *C. brachyotis hoffeti* Bourret, 1944. По доступным изучению зубным остаткам определить подвидовую принадлежность среднеплейстоценового малайского короткомордого крылана из пещеры Там-Хай не представляется возможным. Диапазоны изменчивости размеров зубов в пределах вида довольно широкие (табл. 1).

Таблица 1. Размеры (в мм) щечных зубов представителей рода *Cynopterus* (L – длина, W – ширина; n – число измеренных современных экземпляров)

Вид, подвид	LP ³	WP ³	LP ⁴	WP ⁴	LP ₁	WP ₁	LP ₃	WP ₃	LM ₂	WM ₂
<i>C. brachyotis</i> (Müller, 1838), Там-Хай, Вьетнам, плейстоцен (ПИН)	2.05	1.65	2.1; 2.15; 2.2	1.4; 1.4	1.0	1.25	2.1; 2.1	1.45	1.35	1.0
<i>C. b. hoffeti</i> Bourret, 1944, Вьетнам, современный (ЗММУ, S-173451)	2.0; 2.0	1.4; 1.4	2.1; 2.1	1.45; 1.5	0.85; 0.85	1.1; 1.1	1.9; 1.9	1.4; 1.4	1.25; 1.3	0.85; 0.85
<i>C. b. brachyotis</i> (Müller, 1838) (n = 64) [13]	1.8–2.4	1.5–1.8	1.8–2.5	1.5–1.8	0.8–1.1	1.0–1.3	1.8–2.2	1.2–1.7	1.0–1.3	0.7–1.1
<i>C. sphinx</i> (Vahl, 1797) (n = 21) [13]	2.2–2.8	1.5–1.9	2.2–2.7	1.5–2.0	0.9–1.5	1.0–1.6	2.1–2.7	1.5–1.8	1.4–1.8	1.0–1.3
<i>C. horsfieldii</i> Gray, 1843 (n = 24) [13]	2.2–2.7	1.7–2.0	2.2–2.7	1.8–2.0	0.7–1.1	1.1–1.7	2.0–2.5	1.7–2.0	1.6–1.9	1.0–1.6
<i>C. titthaecheilus</i> (Temminck, 1825) (n = 24) [13]	2.6–2.8	1.9–2.1	2.5–2.9	1.8–2.0	0.9–1.2	1.3–1.7	2.5–2.8	1.8–2.1	1.5–2.0	1.2–1.5
<i>C. minutus</i> Miller, 1906 (n = 6) [13]	1.8–2.1	1.5–1.6	1.9–2.1	1.5–1.6	0.8–1.0	1.0–1.1	1.8–2.0	1.5–1.6	1.2–1.3	0.8–1.0
<i>C. nusatenggara</i> Kitchener et Maharadatunkamsi, 1991 (n = 69) [16]	1.7–2.1	1.4–1.6	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>C. luzoniensis</i> (Peters, 1861) (n = 62) [15]	1.6–2.4	1.2–1.7	–	–	–	–	–	–	–	–

Пещера Там-Хай находится вблизи северо-восточных пределов области современного распространения *C. brachyotis* во Вьетнаме (см. [1, 16]). Данные по филогении и филогеографии *C. brachyotis* [16, 17] указывают на его широкое расселение в Индо-Малайской области в середине плейстоцена. Присутствие остатков малайского короткомордого крылана в отложениях пещеры Там-Хай позволяет заключить, что во второй половине среднего плейстоцена наиболее северные районы Вьетнама входили в область распространения этого вида.

Распространение. Средний плейстоцен, Вьетнам; ныне, Южная Азия (южная Индия, Шри-Ланка), Юго-Восточная Азия (Мьянма, южный Китай, Таиланд, Камбоджа, Лаос, Вьетнам, Малайзия, Сингапур, Индонезия, Восточный Тимор).

Материал. Из местонахождения Там-Хай восемь изолированных зубов: P^3 (экз. ПИН, № 5826/570), три P^4 (экз. ПИН, №№ 5826/504, 571, 820), P_1 (экз. ПИН, № 5826/572), два P_3 (экз. ПИН, №№ 5826/573, 574) и M_2 (экз. ПИН, № 5826/505). Экз. ПИН, №№ 5826/504, 505 происходят из основного костеносного слоя красно-бурых алевролитов верхней галереи пещеры ($21^{\circ}55'51.7''$ с.ш., $106^{\circ}25'3.6''$ в.д.); экз. ПИН, №№ 5826/570–574 и 820 — из обособленной северной галереи ($21^{\circ}55'52.5''$ с.ш., $106^{\circ}25'4.1''$ в.д.).

Подсемейство Rousettinae Andersen, 1912

Триба Rousettini Andersen, 1912

Род *Rousettus* Gray, 1821

Rousettus leschenaultii (Desmarest, 1820)

Pteropus leschenaultii: [18], с. 110.

Синтипы — Национальный музей естественных наук, Париж [13]; Индия, Пондичерри (Пондишери); современные.

Описание (рис. 3, 4). В материале представлены зубы C^1 , P^3 , P^4 , M^1 , P_3 , P_4 , M_2 и M_3 (зубная формула — $I_1^1 C^1 P^1 P^3 P^4 M^1 M^2 / I_1 I_2 C_1 P_1 P_3 P_4 M_1 M_2 M_3$).

Верхний клык C^1 крупный, массивный, слабо изогнутый у вершины (рис. 3). Передний и задний базальные бугорки плохо выражены. Передняя сторона коронки с широкой, умеренно глубокой вертикальной бороздкой, тянущейся по всей высоте, исключая базальную и привершинную части (рис. 3а). Лабиальная сторона выпуклая, лингвальная — уплощенная (рис. 3б, 3в). Задняя сторона с резким килевидным дистальным гребнем и глубоким желобком лабиальнее от него (рис. 3г). Ограничивающий этот желобок лабиальный гребень хорошо выражен (рис. 3б). Довольно широкий цингулюм окаймляет заднюю и лингвальную стороны основания коронки. У основания лингвального ребра апикальнее цингулюма имеется обширная плоская площадка треугольной формы (рис. 3в). Корень толстый.

P^3 высокий, сжатый продольно, с единственным остроконечным главным бугорком и узким задним

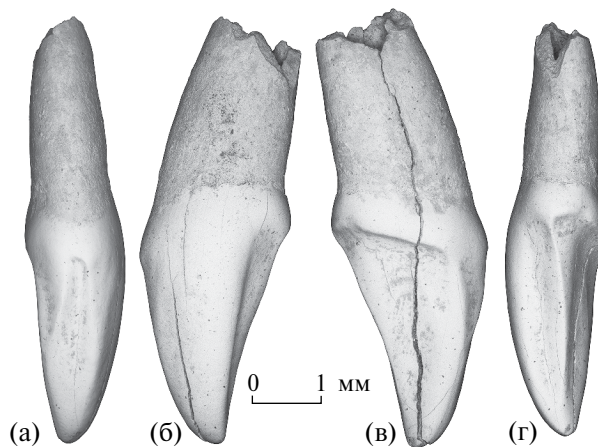


Рис. 3. *Rousettus leschenaultii* (Desmarest, 1820), экз. ПИН, № 5826/563, левый C^1 : а — с передней стороны, б — с лабиальной стороны, в — с лингвальной стороны, г — с задней стороны; Вьетнам, провинция Лангшон, пещера Там-Хай; средний плейстоцен.

базальным выступом (рис. 4а). Антеролингвальная сторона главного бугорка уплощенная, передняя — килевидная. Задний склон главного бугорка довольно крутой (рис. 4б). Лабиальный краевой гребень толстый, субпродольный, лингвальный краевой гребень более тонкий, субвертикальный (рис. 4в). Корни длинные, расходящиеся.

P^4 довольно низкий, короткий, субквадратных или субпрямоугольных очертаний, с узким гребневидным лабиальным бугорком, низким лингвальным бугорком, относительно узким антеролингвальным выступом и более обширным задним базальным выступом (рис. 4г, 4д). Передний и задний края окклюзионной поверхности слегка вогнутые в средней части. Бугорки связаны плохо выраженной комиссурой в виде легкого поперечного возвышения, разграничивающего антеролингвальный выступ и слабо углубленный срединный бассейн заднего базального выступа. Краевые гребни резкие. Корни короткие, расходящиеся.

M^1 с уплощенной низкой коронкой округленно-прямоугольных очертаний (рис. 4е, 4ж). Передний край слегка вогнутый в средней части, задний край выпуклый. Окклюзионная поверхность состоит из переднего (антеролингвального) выступа и двух продольных краевых гребней, разделенных обширным, но неглубоким срединным бассейном. Более высокий лабиальный гребень узкий, особенно в задней части. В передней части этого гребня хорошо различается сильно сжатый поперечно лабиальный бугорок. В передней части лингвального гребня дифференцирован крупный плоский лингвальный бугорок. Лабиальный и лингвальный бугорки мезиальными выростами

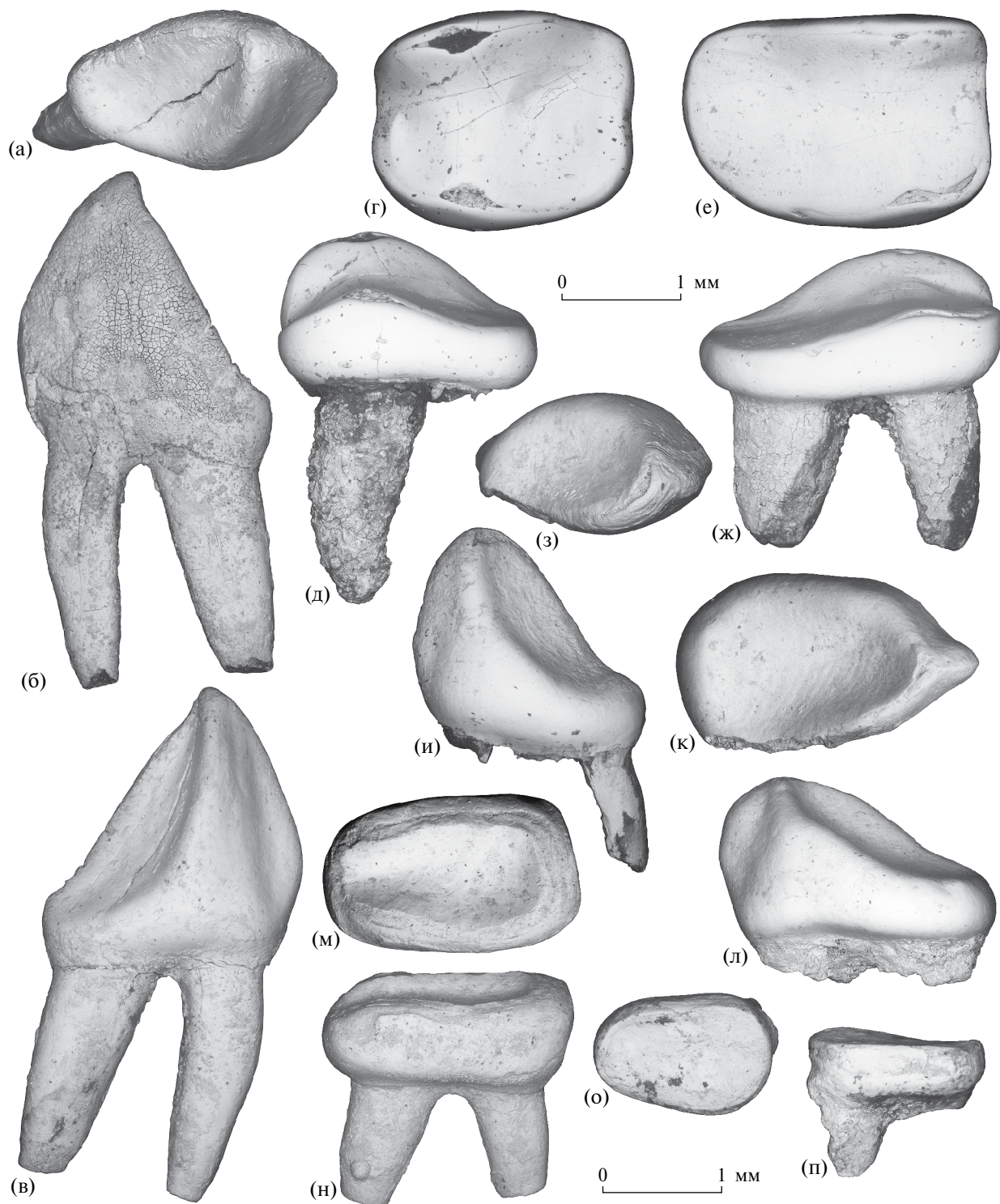


Рис. 4. *Rousettus leschenaultii* (Desmarest, 1820): а–в – экз. ПИН, № 5826/822, правый P³: а – с окклюзиальной стороны, б – с лабиальной стороны, в – с лингвальной стороны; г, д – экз. ПИН, № 5826/615, левый P⁴: г – с окклюзиальной стороны, д – с лингвальной стороны; е, ж – экз. ПИН, № 5826/584, правый M¹: е – с окклюзиальной стороны, ж – с лингвальной стороны; з, и – экз. ПИН, № 5826/564, правый P³: з – с окклюзиальной стороны, и – с лингвальной стороны; к, л – экз. ПИН, № 5826/508, правый P⁴: к – с окклюзиальной стороны, л – с лингвальной стороны; м, н – экз. ПИН, № 5826/597, левый M²: м – с окклюзиальной стороны, н – с лингвальной стороны; о, п – экз. ПИН, № 5826/568, правый M³: о – с окклюзиальной стороны, п – с лингвальной стороны; Вьетнам, провинция Лангшон, пещера Там-Хай; средний плейстоцен.

связаны с передним краевым гребнем. Комиссура едва намечена. Поверхностный срединный бассейн спереди переходит в бассейн антеролингвального выступа (слегка выделенный комиссурой), а сзади окаймлен тонким гребнем. Корни короткие, широко расставленные.

P_3 сравнительно высокий, но туповершинный. Передняя сторона коронки килевидно сжатая (рис. 4з). Главный бугорок массивный, с мощным лабиальным краевым гребнем и слабее выраженным лингвальным гребнем. Вершина главного бугорка расширена поперечно. В привершинной части эмаль слабо морщинистая (рис. 4з). Задний склон главного бугорка относительно крутой (рис. 4и). Задний базальный выступ короткий, узкий (отчетливо уже главного бугорка), срединный бассейн слегка углубленный. Корни умеренно длинные.

P_4 относительно низкий, туповершинный. Передняя сторона коронки килевидная (рис. 4к). Главный бугорок массивный, с мощными краевыми гребнями. Задний склон главного бугорка относительно пологий (рис. 4л). Задний базальный выступ длинный, относительно широкий (шире главного бугорка или равен ему), срединный бассейн умеренно углубленный. Эмаль между продольными краевыми гребнями слабо морщинистая (рис. 4к). Корни короткие, субпараллельные, задний корень толще переднего.

M_2 с плосковершинной округленно-прямоугольной коронкой. Задняя часть коронки несколько уже передней. Слегка углубленный срединный бассейн окружен низкими краевыми гребнями, но имеет узкий дистальный выход (рис. 4м). Корни короткие, толстые, расходящиеся (рис. 4н).

M_3 мелкий, двухкорневой, с низкой плосковершинной коронкой удлиненной эллипсовидной формы (рис. 4о). Задняя часть коронки заметно уже передней. Передний и задний края окклюзионной поверхности дугобразно выпуклые. Окклюзионная поверхность слегка вогнутая, по периметру окаймлена низким краевым гребнем, со слабым возвышением в антеролабиальном углу (рис. 4п). Корни короткие.

Размеры, в мм. C^1 : $L - 2.4$; $W - 1.6$; лабиальная высота — 4.0 (экз. ПИН, № 5826/563); P^3 : $L - 2.1$ (экз. ПИН, № 5826/821); $L - 2.3$ (экз. ПИН, № 5826/509); $W - 1.35$ (экз. ПИН, № 5826/822); P^4 : $L - 2.3$; $W - 1.95$ (экз. ПИН, № 5826/615); $L - 2.35$ (экз. ПИН, № 5826/575); M^1 : $L - 2.7$; $W - 1.95$ (экз. ПИН, № 5826/584); P_3 : $L - 2.2$; $W - 1.15$ (экз. ПИН, № 5826/564); P_4 : $L - 2.5$; $W - 1.45$ (экз. ПИН, № 5826/514); $L - 2.5$; $W - 1.5$ (экз. ПИН, № 5826/508); $L - 2.65$; $W - 1.32$ (экз. ПИН, № 5826/565); M_2 : $L - 2.15$; $W - 1.4$ (экз. ПИН, № 5826/597); M_3 : $L - 1.65$; $W - 1.1$ (экз. ПИН, № 5826/568).

Сравнение и замечания. Широко распространенный род *Rousettus* представлен в континентальной Юго-Восточной Азии двумя симпатрическими современными видами: *R. leschenaultii* и *R. amplexicaudatus*. В строении зубов эти близкие по размерам виды (см. табл. 2) принято различать по форме задних моляров M^2 и M_3 , продольно вытянутых у *R. leschenaultii* и округлых у *R. amplexicaudatus* [1, 10, 13, 19]. Кроме того, P^4 и M^1 у *R. leschenaultii* имеют более низкие лабиальные бугорки и гребни по сравнению с таковыми у *R. amplexicaudatus*. По всем зубным признакам, как и по размерам

Таблица 2. Размеры (в мм) щечных зубов представителей родов *Rousettus* и *Eonycteris* (L — длина, W — ширина; n — число измеренных современных экземпляров)

Параметр	<i>R. leschenaultii</i> , Там-Хай, Вьетнам, плейстоцен (ПИН)	<i>R. leschenaultii</i> , Вьетнам, современный (ЗММУ, S-115208)	<i>R. leschenaultii</i> ($n = 6$) [13]	<i>R. amplexicaudatus</i> ($n = 13$ [13], $n = 43$ [19])	<i>E. spelaea</i> , Там-Хай, Вьетнам, плейстоцен (ПИН)	<i>E. spelaea</i> ($n = 16$) [13]
LP^3	2.1; 2.3; 2.3	2.3	2.5–2.6	2.2–2.7 [13]	—	1.8–2.2
WP^3	1.35	1.3	1.3–1.5	1.2–1.6 [13]	—	0.9–1.1
LP^4	2.3; 2.35	2.4; 2.45	2.6–2.8	2.3–2.7 [13]; 2.2–2.64 [19]	—	1.8–2.4
WP^4	1.95	1.75; 1.75	1.7–1.8	1.6–1.9 [13]; 1.4–1.88 [19]	—	1.1–1.5
LM^1	2.7	2.6; 2.6	2.8–2.9	2.5–2.8 [13]; 2.28–3.0 [19]	—	2.0–2.6
WM^1	1.95	1.75; 1.8	1.7–1.8	1.6–1.8 [13]; 1.52–1.88 [19]	—	1.0–1.4
LP_3	2.2	2.05	2.1–2.5	2.0–2.5 [13]	1.6	1.6–1.9
WP_3	1.15	1.2	1.4–1.5	1.1–1.5 [13]	—	0.8–1.0
LP_4	2.5; 2.5; 2.65	2.5; 2.5	2.5–2.6	2.2–2.7 [13]	~1.8	1.8–2.0
WP_4	1.32; 1.45; 1.5	1.7; 1.7	1.4–1.6	1.4–1.8 [13]	1.1	1.0–1.2
LM_2	2.15	2.2; 2.2	2.2–2.6	2.0–2.7 [13]; 1.8–2.32 [19]	—	1.2–1.7
WM_2	1.4	1.5; 1.5	1.4–1.5	1.4–1.7 [13]; 1.32–1.6 [19]	—	0.9–1.1
LM_3	1.65	1.55; 1.55	1.7–2.1	1.2–1.7 [13]; 1.04–1.72 [19]	—	0.5–1.2
WM_3	1.1	1.1; 1.12	0.9–1.2	1.0–1.2 [13]; 0.8–1.24 [19]	—	0.5–0.9

сохранившихся премоляров и моляров (табл. 2), летучая собака из среднего плейстоцена пещеры Там-Хай соответствует *R. leschenaultii*.

Распространение. Средний плейстоцен, Вьетнам; ныне, Южная Азия (Пакистан, Индия, Непал, Бутан, Бангладеш, Шри-Ланка), Юго-Восточная Азия (Мьянма, южный Китай, Таиланд, Камбоджа, Лаос, Вьетнам, Индонезия).

Материал. Из местонахождения Там-Хай 13 изолированных зубов: C^1 (экз. ПИН, № 5826/563), три P^3 (экз. ПИН, №№ 5826/509, 822, 825), два P^4 (экз. ПИН, №№ 5826/575, 615), M^1 (экз. ПИН, № 5826/584), P_3 (экз. ПИН, № 5826/564), три P_4 (экз. ПИН, №№ 5826/508, 514, 565), M_2 (экз. ПИН, № 5826/597) и M_3 (экз. ПИН, № 5826/568). Экз. ПИН, №№ 5826/508, 509, 514 из основного костеносного слоя красно-бурых алевролитов верхней галереи пещеры; прочие — из обособленной северной галереи.

Триба Eonycterini Almeida, Giannini et Simmons, 2016
Род *Eonycteris* Dobson, 1873
Eonycteris spelaea (Dobson, 1871)

Macroglossus spelaeus: [20], с. 105.

Голотип — Индийский музей, Калькутта, № 78 [20], взрослый самец; Мьянма, Моламыин (Mawlamyine, Moulmein), пещеры Фарм; современный.

Описание (рис. 5). В материале достоверно представлены нижние предкоренные зубы P_3 и P_4 (зубная формула — $I^1I^2C^1P^1P^3P^4M^1M^2/I_1I_2C_1P_1P_3P_4M_1M_2M_3$).

P_3 относительно высокий, островершинный. Передняя сторона главного бугорка выпуклая, с четким передним ребром (рис. 5а). Главный бугорок поперечно сжатый, с резким лабиальным краевым гребнем. Лингвальный краевой гребень отсутствует. Задний склон главного бугорка довольно крутой (рис. 5б). Задний базальный выступ относительно узкий, бассейн не выражен. Корни длинные.

P_4 сравнительно низкий, туповершинный. Передняя сторона коронки выпуклая, широкая, с заметным передним килевидным гребнем в апикальной части (рис. 5в). Главный бугорок массивный. Лабиальный краевой гребень сильно развит, лингвальный гребень сглажен, имеет вид легкой выпуклости. Задний склон главного бугорка пологий (рис. 5г, 5д). Задний базальный выступ длинный, широкий (шире главного бугорка), плоский, без бассейна. Краевые гребни на заднем базальном выступе тонкие, но отчетливые.

Размеры, в мм. P_3 : L — 1.6 (экз. ПИН, № 5826/593); P_4 : L — ~1.8; W — 1.1 (экз. ПИН, № 5826/577).

Сравнение и замечания. Судя по строению и размерам (табл. 2), описанные изолированные зубы принадлежат *E. spelaea*. Для P_3 характерны отсутствие лингвального краевого гребня и узкий задний базальный выступ, для P_4 — наличие

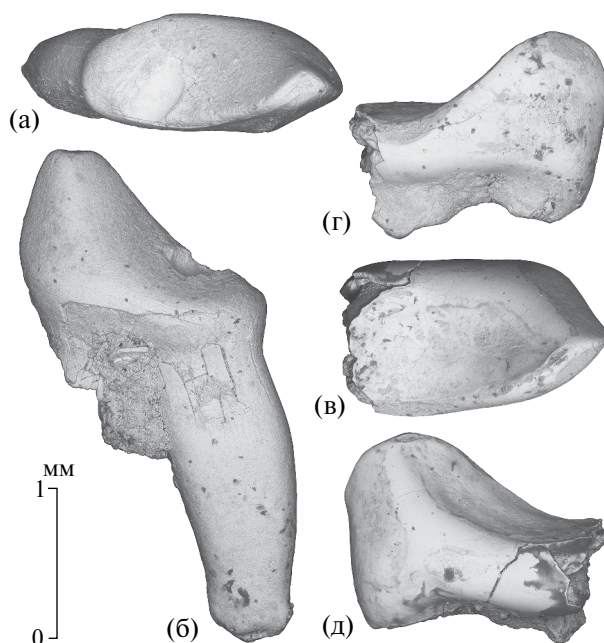


Рис. 5. *Eonycteris spelaea* (Dobson, 1871): а, б — экз. ПИН, № 5826/593, правый P_3 : а — с окклюзиальной стороны, б — с лингвальной стороны; в—д — экз. ПИН, № 5826/577, правый P_4 : в — с окклюзиальной стороны, г — с лабиальной стороны, д — с лингвальной стороны; Вьетнам, провинция Лангшон, пещера Там-Хай; средний плейстоцен.

килевидного переднего гребня, слабо выраженный лингвальный краевой гребень и широкий плоский задний базальный выступ. От двух других видов рода *Eonycteris*, *E. major* Andersen, 1910 (Калимантан) и *E. robusta* Miller, 1913 (Филиппины), отличается более мелкими размерами.

Распространение. Средний плейстоцен, Вьетнам; ныне, Южная Азия (северо-восток и юг Индии, Непал), Юго-Восточная Азия.

Материал. Из обособленной северной галереи пещеры Там-Хай два изолированных зуба: P_3 (экз. ПИН, № 5826/593) и P_4 (экз. ПИН, № 5826/577).

Изученные образцы представляют собой первые ископаемые находки Pteropodidae во Вьетнаме. *Synopterus brachyotis* в настоящее время широко распространен в Индо-Малайской области [1, 10, 16, 17]. В качестве укрытий крыланы этого вида используют не только деревья, но и пещеры. Поэтому в экологическом отношении находка остатков *S. brachyotis* в пещере Там-Хай вполне объяснима. Летучие собаки, в частности, распространены во Вьетнаме виды *Rousettus leschenaultii* и *R. amplexicaudatus*, обычно связаны с пещерами [10]. К числу троглофильных форм относятся и пещерные крыланы, включая обитающий во Вьетнаме вид *Eonycteris spelaea*. Соответственно, присутствие

представителей родов *Rousettus* и *Eonycteris* в тафогенозе изученного местонахождения также ожидаемо. Таким образом, среднеплейстоценовая ассоциация крыланов из местонахождения Там-Хай может в основном отражать состав видов Pteropodidae, селившихся в местных пещерах.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарен Е.Н. Машенко, Н.В. Волковой, Б.И. Морковину, А.В. Подлеснову, К.К. Тарасенко (ПИН) и Ле Суан Даку (Институт тропической экологии Совместного Российско-Вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра, Ханой) за участие в сборах материалов, А.Н. Кузнецову и С.П. Кузнецовой (Совместный Российско-Вьетнамский тропический научно-исследовательский и технологический центр) — за помощь в организации экспедиции, С.В. Крускопу (ЗММУ) — за предоставленную возможность работы с коллекционными образцами ЗММУ, Р.А. Ракитову (ПИН) — за техническую помощь в подготовке иллюстраций на СЭМ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

У автора нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Giannini N.P.* Family Pteropodidae (Old World fruit bats) // *Handbook of the mammals of the World*. V. 9. Bats / Eds D.E. Wilson, R.A. Mittermeier. Barcelona: Lynx Edicions, 2019. P. 16–163.
2. *Almeida F.C., Simmons N.B., Giannini N.P.* A species-level phylogeny of Old World fruit bats with a new higher-level classification of the family Pteropodidae // *American Museum Novitates*. 2020. № 3950. P. 1–24.
3. *Eiting T.P., Gunnell G.F.* Global completeness of the bat fossil record // *Journal of Mammalian Evolution*. 2009. V. 16. № 3. P. 151–173.
4. *Rosina V.V., Pickford M.* Preliminary overview of the fossil record of bats (Chiroptera, Mammalia) from the Miocene sites of Otavi Mountainland (Northern Namibia) // *Communications of the Geological Survey of Namibia*. 2019. V. 21. P. 48–58.
5. *Pearch M.J., Bumrungsri S., Schwenninger J.-L. et al.* A review of the Cainozoic small mammal fauna of Thailand with new records (Chiroptera; Scandentia; Eulipotyphla) from the late Pleistocene // *Cainozoic Research*. 2013. V. 10. № 1–2. P. 59–98.
6. *Gunnell G.F., Manthi F.K.* Pliocene bats (Chiroptera) from Kanapoi, Turkana Basin, Kenya // *Journal of Human Evolution*. 2020. V. 140. Art. 102440. P. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2018.01.001>
7. *Olsen J.W., Ciochon R.L.* A review of evidence for postulated Middle Pleistocene occupations in Viet Nam // *Journal of Human Evolution*. 1990. V. 19. P. 761–788.
8. *Ciochon R., Long V.T., Larick R. et al.* Dated co-occurrence of *Homo erectus* and *Gigantopithecus* from Tham Khuyen Cave, Vietnam // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996. V. 93. № 7. P. 3016–3020.
9. *Лопатин А.В.* Новый вид *Typhlomys* (Platacanthomyidae, Rodentia) из среднего плейстоцена северного Вьетнама // *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни*. 2021. Т. 501. № 1. С. 505–510.
10. *Borissenko A.V., Kruskop S.V.* Bats of Vietnam and adjacent territories. An identification manual. Moscow, 2003.
11. *Thong V.D., Denzinger A., Sang N.V. et al.* Bat diversity in Cat Ba Biosphere Reserve, northeastern Vietnam: a review with new records from mangrove ecosystem // *Diversity*. 2021. V. 13. № 8. Art. 376. P. 1–29.
12. *Giannini N.P., Wible J.R., Simmons N.B.* On the cranial osteology of Chiroptera. I. *Pteropus* (Megachiroptera: Pteropodidae) // *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 2006. № 295. P. 1–134.
13. *Andersen K.C.* Catalogue of the Chiroptera in the collection of the British Museum. V. I: Megachiroptera. London: Trustees British Museum (Natural History), 1912.
14. *Müller S.* Over eenige nieuwe zoogdieren van Borneo // *Tijdschrift voor Natuurlijke Geschiedenis en Physiologie*. 1838. V. 5. P. 134–150.
15. *Storz J.F., Kunz T.H.* *Cynopterus sphinx* // *Mammalian Species*. 1999. № 613. P. 1–8.
16. *Campbell P., Schneider C.J., Adnan A. et al.* Phylogeny and phylogeography of Old World fruit bats in the

- Cynopterus brachyotis* complex // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2004. V. 33. № 3. P. 764–781.
17. Mubarok H., Handayani N.S.N., Maryanto I., Arisuryanti T. Phylogenetic and genetic variation analysis of lesser short-nosed fruit bat *Cynopterus brachyotis* (Müller 1838) on Java island, Indonesia, inferred from mitochondrial *D-loop* // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2023. V. 21. № 1. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1186/s43141-022-00460-y>
 18. Desmarest A.G. Encyclopédie méthodique. Pt 1. Mammalogie ou description des espèces de mammifères. Paris: Agasse, 1820.
 19. Rookmaaker L.C., Bergmans W. Taxonomy and geography of *Rousettus amplexicaudatus* (Geoffroy, 1810) with comparative notes on sympatric congeners (Mammalia, Megachiroptera) // Beaufortia. 1981. V. 31. № 1. P. 1–29.
 20. Dobson G.E. On some new species of Malayan bats from the collection of Dr. Stoliczka // Proceedings of the Asiatic Society of Bengal. 1871. V. 40. P. 105–108.

OLD WORLD FRUIT BATS (PTEROPODIDAE, CHIROPTERA) FROM THE PLEISTOCENE OF VIETNAM

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

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

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

Isolated teeth of a lesser short-nosed fruit bat *Cynopterus brachyotis* (Müller, 1838), a fulvous fruit bat *Rousettus leschenaultii* (Desmarest, 1820), and a dawn bat *Eonycteris spelaea* (Dobson, 1871) are described from the Middle Pleistocene Tham Hai cave locality in northern Vietnam (Lang Son Province). These are the first fossil findings of the Old World fruit bats in Vietnam. The Middle Pleistocene association of Pteropodidae from the Tham Hai locality may largely reflect the composition of species that roosted in local caves.

Keywords: *Cynopterus brachyotis*, *Rousettus leschenaultii*, *Eonycteris spelaea*, Old World fruit bats, Pteropodidae, Chiroptera, Middle Pleistocene, Vietnam, Lang Son

УДК 569.51:551.782 (470.621)

НАХОДКИ ЧЕРЕПОВ ЮВЕНИЛЬНЫХ ОСОБЕЙ *KURDALAGONUS MAICOPICUS* (CETACEA, CETOTHERIIDAE) В ВЕРХНЕМ МИОЦЕНЕ РЕСПУБЛИКИ АДЫГЕЯ

© 2024 г. К. К. Тарасенко¹, *

Представлено академиком РАН А.В. Лопатиным

Поступило 15.03.2024 г.

После доработки 25.03.2024 г.

Принято к публикации 30.03.2024 г.

Из местонахождения Фортепьянка 2 (Россия, Республика Адыгея, Майкопский р-н, долина р. Фортепьянка, верхний миоцен, верхний сармат, блиновская свита) описаны фрагменты двух черепов молодых цетотериевых усатых китов. На основании морфологии заднего (сосцевидного) отростка каменистой кости, строения заднего края височного окна, S-образной формы верхнезатылочных гребней находки отнесены к *Kurdalagonus maicopicus* (Spasskii, 1951). Пропорции черепа, степень зарастания швов черепа позволили установить индивидуальный возраст этих китов в пределах года. Новые находки существенно дополняют данные о строении швов боковой стенки черепа и возрастной изменчивости краниальной морфологии у представителей рода *Kurdalagonus*.

Ключевые слова: *Kurdalagonus*, поздний миоцен, Республика Адыгея, *Cetotheriidae*, блиновская свита, средний сармат, верхний сармат

DOI: 10.31857/S2686738924040027

Представители рода *Kurdalagonus* известны из верхнемиоценовых отложений местонахождений Республики Адыгея: Нагиеж-Уашх, Фортепьянка 1, 2 и Майкоп [1–3]. Местонахождение Фортепьянка (Россия, Республика Адыгея, Майкопский р-н, долина р. Фортепьянки, 44°35'21" N, 40°01'53" E) характеризуется наибольшим числом находок *Kurdalagonus maicopicus* (Spasskii, 1951) [2]. Ранее отсюда был кратко описан фрагмент чешуйчатой и верхнезатылочной костей черепа новорожденного кита [4], однако степень их сохранности не позволяла изучить в полной мере морфологию швов боковой стенки черепа у этих китов. Новый материал, описываемый в данной работе, позволил детально рассмотреть строение швов и поверхности боковой стенки черепа у самых молодых *K. maicopicus* (Spasskii, 1951).

Цетотериевые киты рода *Kurdalagonus* отличаются формой височного окна — в форме треугольника Рело, повернутого вбок (у *Cetotherium* височное окно вытянуто-овальное [5, 6],

у *Brandocetus* — округленный ромбоид [7], у *Otradnocetus* — параллелограмм с вогнутой стороной [8]), строением заднего отростка каменистой кости [1], а также S-образной формой верхнезатылочных гребней (прямые у *Cetotherium* и *Zygiocetus*). На основании строения заднего края височного окна, морфологии заднебоковой стенки черепа и заднего отростка каменистой кости новая находка (фрагмент правой части мозговой коробки) отнесена к *Kurdalagonus maicopicus* (Spasskii, 1951). Ниже приведено описание новой находки и дано сравнение с другими образцами и интерпретация индивидуального возраста известных представителей *K. maicopicus*.

Изученный материал хранится в Палеонтологическом институте им. А.А. Борисяка РАН (ПИН) в Москве и включает: лектотип ПИН, №764/1, неполный череп; Россия, Республика Адыгея, левый берег р. Белой, г. Майкоп, местонахождение ГЭС; верхи среднего миоцена, средний сармат, блиновская свита; экз. ПИН, №5462/84, экз. ПИН, №5462/42, экз. ПИН, №5462/35 — фрагменты правой части мозговой коробки черепа, экз. ПИН, №5462/34 — верхнезатылочная кость, 5462/33 — правая лобная кость с надглазничным отростком; Фортепьянка 2, Россия, Республика Адыгея, Майкопский р-н, долина р. Фортепьянки; верхний

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

*e-mail: tarasenkokk@gmail.com

Таблица 1. Промеры боковой стенки черепа у *Kurdalagonus taicopicus* (Spasskii, 1951) разного индивидуального возраста

Экз. ПИН	Промеры (мм)					
	Длина чешуйчатой кости от верхнезатылочного гребня до нижнего края (контакт с клиновидной костью)	Длина чешуйчатой щели	Ширина клиновидной кости	Длина шва между задним отростком каменистой кости (сосцевидный отросток) и чешуйчатой костью	Высота боковой затылочной кости по линии от шейного гребня до основания кости	Длина заднебоковой стенки черепа от края боковой затылочной кости до основания засочленового отростка
№764/1 (лектотип)	126.2	отсутствует	16.6	28.2	87.48	56.2
№5462/35	—	—	—	17.5	—	—
№5462/42	128.7	29	9.2	20	76.4	50
№5462/ 84	103.6	21.3	12.6	13.8	52 e	49.3

миоцен, блиновская свита. Образцы обрабатывались в 10% растворе уксусной кислоты для отчистки поверхности костей с возможностью описать структуру поверхности кости и степень поверхностного за­растания шва.

Иллюстрации подготовлены при помощи цифровой камеры Armor X5 Pro и рентгеновско­го микротомографа Neoscan N80 (ПИН). Па­раметры сканирования экз. ПИН, №5462/84 и экз. ПИН 5462/33: 84кВ, 48 мкА, размер пиксе­ля 5.5 мкм, поворот на 180° с шагом 0.2°, фильтр Cu 0.5 мм. Визуализация 3D моделей с помощью CTvox (Bruker microCT).

Экз. ПИН, №5462/84 существенно уступает по размерам лектотипу ПИН, №764/1 (см. табл. 1, рис. 1). На экземпляре ПИН, №5462/84 видно, что все швы еще не облетерированы. Чешуйча­тая щель хорошо выражена, как и на экз. ПИН, №5462/42, в то время как у лектотипа она прак­тически не прослеживается. Клиновидная кость сужается в сторону чешуйчато-теменного шва и широкая у основания, на других образцах она более прямоугольная и вытянутая; на уров­не чешуйчато-теменного шва заметна отчетли­вая впадина, затрагивающая край клиновидной кости, а также прилегающие края чешуйчатой и теменной костей (в этом месте поверхность костей покрыта многочисленными небольшо­ми питательными отверстиями, рис. 2). На ис­следуемом образце наиболее плотные участки кости представлены боковой затылочной ко­стью, задним отростком каменистой кости (со­сцевидным отростком), основанием чешуйча­той кости и задним краем теменной кости (рис. 2б). У описываемого экз. ПИН, №5462/84 шов между чешуйчатой и боковой затылочной кость­ми не облетерирован, но шовная поверхность чешуйчатой кости более выровненная (рис. 2в), в отличие от экз. ПИН, №5462/35, где эта

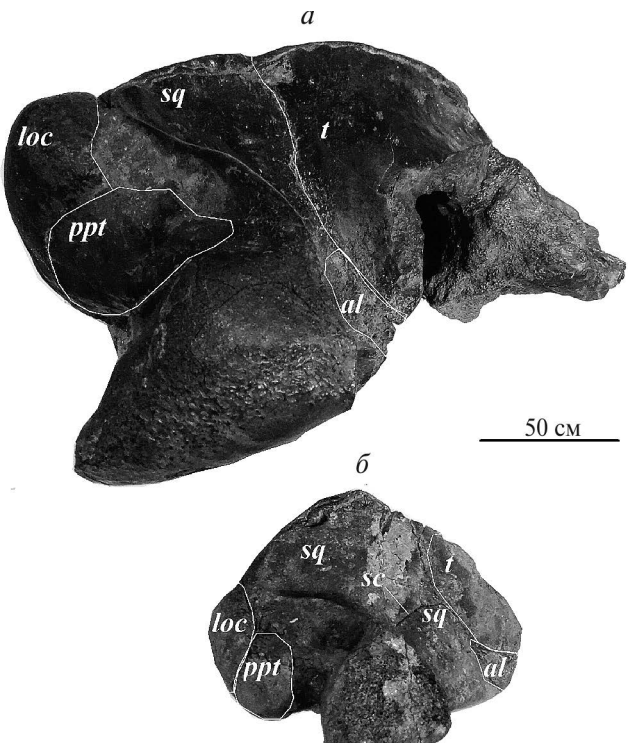


Рис. 1. Строение боковой стенки черепа *Kurdalagonus taicopicus* (Spasskii, 1951) разного индивидуального возраста: а – лектотип ПИН, №764/1; неполный че­реп; Россия, Республика Адыгея, левый берег р. Бе­лой, г. Майкоп, местонахождение ГЭС; верхи сред­него миоцена, средний сармат, блиновская свита, б – экз. ПИН 5462/ 84; фрагмент черепа; Рес­публика Адыгея, Майкопский р-н, долина р. Фор­тепьянки, местонахождение Фортетьянка 2; верхи среднего миоцена, средний сармат, блиновская свита. Обозначения: al – клиновидная кость; loc – боковая затылочная кость; ppt – задний отросток каменистой кости (сосцевидный отросток); sc – щель чешуйчатой кости; sq – чешуйчатая кость; t – теменная кость.

поверхность ругозистая (морщинистая) — на уровне затылочно-сосцевидного шва. Начальная стадия облитерации шва теменной и клиновидной кости хорошо заметна (рис. 2а), этот процесс начинается не с внутренней поверхности шва, а идет по центру шва, где прослеживается перемячка толщиной в 6 мм.

Экземпляр ПИН, №5462/35 представлен фрагментом чешуйчатой кости (рис. 3а), здесь сохранилась верхняя часть до уровня чешуйчатой щели и скулового отростка чешуйчатой кости. На шовной поверхности различима площадка для сочленения с задним отростком каменистой кости, которая имеет форму вытянутого полуэллипса неправильной формы. Над ней расположена сочленовная поверхность с боковой затылочной костью, очень ругозистая, трапецевидной формы. Выше располагается поверхность для прикрепления боковой поверхности верхнезатылочной кости (рис. 3б). Ругозистая шовная поверхность чешуйчатой кости образца 5462/35 свидетельствует о возможном наличии в этом месте синдесмоза.

Из местонахождения Фортетьянка 2 известна изолированная верхнезатылочная кость (экз. ПИН, №5462/34), которая по пропорциям сопоставима с экз. ПИН, №5462/35 и экз. ПИН, №5462/84. Костная ткань не плотная, довольно пористая, на вентральной поверхности хорошо выражена кавернозная и продольно исчерченная шовная поверхность — место прикрепления теменных костей. На дорсальной поверхности кости хорошо выражен поперечный гребень верхнезатылочной кости, а также различимые на переднем конце кости ямки для прикрепления семиспинальной мускулатуры.

Экз. ПИН, №5462/33 (рис. 4а) представлен лобной костью с хорошо сформированным надглазничным отростком. На боковой поверхности, которая формирует боковую стенку черепной коробки, различимы борозды шовной поверхности лобно-теменного шва, а также небольшой сохранившийся фрагмент теменной кости (рис. 4б). На переднем крае надглазничного отростка, ближе к лобно-челюстному шву, прослеживается небольшая предглазничная вырезка. На передней поверхности кости, под отростком лобно-челюстного шва, хорошо различимо отверстие обонятельного нерва (рис. 4в), а в полости остатки решетчатой кости. Очевидно, как и у взрослых животных, лобные кости формируют лобный шов, но исключены из формирования вершины черепа. По пропорциям этот экземпляр ближе всего к возрастной группе экз. ПИН, №5462/84 и экз. ПИН, №5462/35.

У эмбриона усатых китов на поздних стадиях практически полностью оксифицируются все основные кости черепа [9], а швы между затылочными

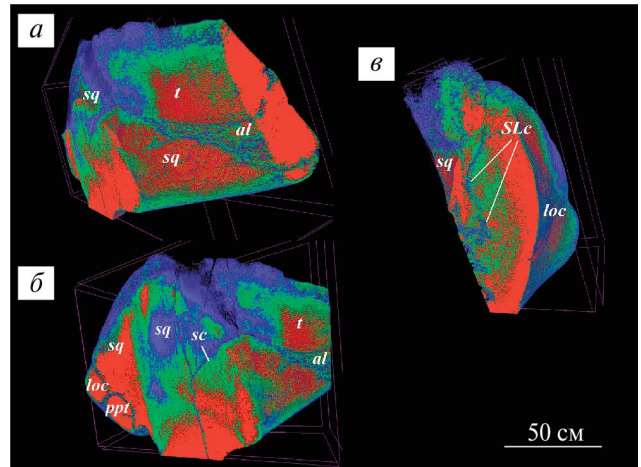


Рис. 2. 3D визуализация боковой стенки черепа *Kurdalagonus maicopicus* (Spasskii, 1951), экз. ПИН 5462/ 84, фрагмент черепа; Россия, Республика Адыгея, Майкопский р-н, долина р. Фортетьянки, местонахождение Фортетьянка 2; верхи среднего миоцена, средний сармат, блиновская свита: а — латерально с виртуальным сагиттальным срезом через основание скулового отростка чешуйчатой кости; б — антеролатерально с виртуальным поперечным срезом через клиновидную и теменную кости, виртуальным сагиттальным срезом через основание скулового отростка чешуйчатой кости; в — виртуальный сагиттальный срез стенки черепа *Kurdalagonus maicopicus* (Spasskii, 1951) через шов чешуйчатой-боковой затылочной кости. Красным обозначены более плотные участки кости, зеленым, сине-зеленым и синим менее плотные, отверстия, пустоты и швы — темно-синий цвет. Обозначения: al — клиновидная кость; loc — боковая затылочная кость; ppt — задний отросток каменистой кости (сосцевидный отросток); sc — щель чешуйчатой кости; sq — чешуйчатая кость; SLc — шов между чешуйчатой и боковой затылочной костями; t — теменная кость.

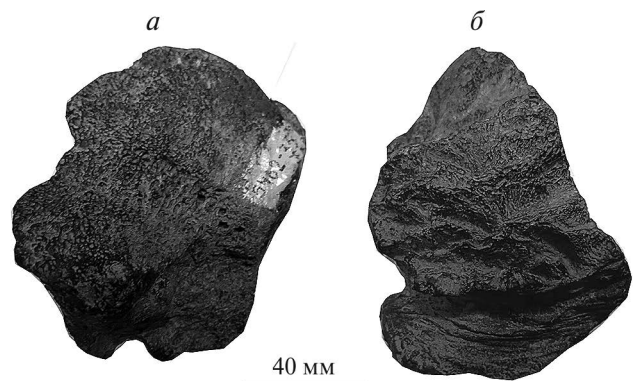


Рис. 3. *Kurdalagonus maicopicus* (Spasskii, 1951), экз. ПИН, №5462/35, фрагмент правой части мозговой коробки черепа (верхняя часть чешуйчатой кости); фрагмент черепа; Россия, Республика Адыгея, Майкопский р-н, долина р. Фортетьянки, местонахождение Фортетьянка 2; верхи среднего миоцена, средний сармат, блиновская свита: а — вид сбоку, б — вид сзади.

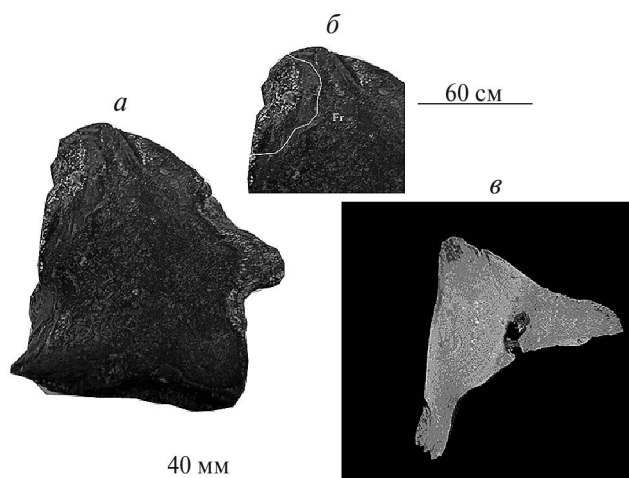


Рис. 4. *Kurdalagonus maicopicus* (Spasskii, 1951), экз. ПИН, №5462/33, правая лобная кость; фрагмент черепа; Россия, Республика Адыгея, Майкопский р-н, долина р. Фортепьянки, местонахождение Фортепьянка; верхи среднего миоцена, средний сармат, блиновская свита: а — вид сбоку, б — вид сбоку (увеличение), в — Восстановленный виртуальный срез через лобную кость, на уровне выхода обонятельного нерва.

элементами в задней части черепа начинают оксифицироваться только постнатально у баленоптерид и серых китов [10].

Новорожденные баленоптериды отличаются по размерам, их длина колеблется от 2.5 м у малого полосатика до 8 м у синего кита [9, 11–13]. Учитывая эти данные, а также максимальные размеры взрослого малого полосатика — до 10.7 м [14] и взрослого синего кита — до 33 м [15], можно оценивать размеры новорожденных детенышей как 22–23% от размера взрослых животных. Для годовалых молодых китов пропорции к половозрелым животным составляют 65–70% [12].

Таким образом, сравнивая пропорции чешуйчатой, теменной костей и заднего (мастоидного) отростка каменистой кости индивидуальный возраст кита, описываемого в данной работе (экз. ПИН, №5462/84), в пределах одного года. Другой образец, описанный ранее [4] из местонахождения Фортепьянка (экз. ПИН, №5462/35) представляет более раннюю постнатальную стадию, судя по характеру шовной поверхности чешуйчатой кости (ругозистость) и несформированности шва между чешуйчатой и боковой затылочной костями. В свою очередь пропорции черепа лектотипа рода *Kurdalagonus* (см. табл. 1) — заросшая щель чешуйчатой кости; полная облитерация чешуйчато-теменного, затылочно-сосцевидного и ламбдоидного швов (рис. 1) — характеризуют его как половозрелую молодую особь возрастом от двух и более лет.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках государственного задания ПИН РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

В работе отсутствуют эксперименты с людьми и живыми животными, анализировались только палеонтологические образцы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарен академику А.В. Лопатину (ПИН РАН) за обсуждение текста, Р.А. Ракитову (ПИН РАН) за помощь в работе с Neoscan N80.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тарасенко К.К., Лопатин А.В. Новые роды усатых китов (Cetacea, Mammalia) из миоцена Северного Кавказа и Предкавказья: 1. *Kurdalagonus* gen. nov. из среднего-позднего сармата Адыгеи // Палеонтол. журн. 2012. №5. С. 86–98.
2. Вислобокова И.А., Тарасенко К.К. Находки жвачных (Artiodactyla, Ruminantia) и новые данные по стратиграфии позднемиоценового местонахождения (Фортепьянка 2 Северный Кавказ, Республика Адыгея) // Палеонтол. журн. 2019. №6. С. 105–110.
3. Tesakov F.S., Titov V.V., Simakova A.N. et al. Late Miocene (Early Turolian) vertebrate faunas and associated biotic record of the northern Caucasus: geology, taxonomy, palaeoenvironment, biochronology // Fossil imprint. 2014. V.73. №3–4. P. 383–444.
4. Tarasenko K.K. A new finding of a perinate baleen whale (MAMMALIA: CETACEA) from locality Fortep'yanka 2 (Republique Adygea, Russia) // XVI Annual Meeting of the European Association of Vertebrate Palaeontology. Caparica, 2018. P. 184.
5. Brandt J.F. // Bull. Acad. Imp. Sci. St. Petersburg. Cl. Phys.-Math. 1843. Ser. 2. V. 1. No 10–12. P. 145–148.
6. Gol'din P., Startsev D., Krakhmalnaya T. The Anatomy of the Late Miocene Baleen Whale *Cetotherium riabinini* from Ukraine // Acta Palaeontol. Pol. 2014. V. 59. No 4. P. 795–814.
7. Gol'din P.E., Startsev D.B. Brandtocetus, a New Genus of Baleen Whales (Cetacea, Cetotheriidae) from the Late Miocene of Crimea, Ukraine // Journ. Vertebr. Paleontol. 2014. V. 34. No 2. P. 419–433.

8. Мчедлидзе Г.А. Ископаемый кит из миоценовых отложений окрестностей станицы Отрадная. Мецниереба. Тбилиси. 1984. 65 с.
9. Lanzetti A., Berta A., Ekdale E. Prenatal development of the humpback whale: growth rate, tooth loss and skull shape changes in an evolutionary framework // The Anatomical Record. 2018. № 22. P. 180–204.
10. Walsh B.M., Berta A. Occipital ossification of balaenopteroid mysticetes // Anat Rec. 2011. №294. P. 391–398.
11. Laws R.M. The foetal growth rates of whales with special reference to the fin whale, Balaenoptera physalus // Linn. Discov Reports. 1959. №29. P. 281–308.
12. Томилин А.Г. Китообразные фауны морей СССР. Москва: Издательство академии наук СССР, 1962. – 218 с.
13. Frazer J.F.D., Huggett A.S.G. Specific foetal growth rates of cetaceans // J Zool. 1973. №169. P. 111–126.
14. Don E. Wilson & DeeAnn M. Reeder (editors). Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference (3rd ed). Johns Hopkins University Press. 2. 2005. 142 p.
15. Wilson D.E., Mittermeier R.A. (chief editors): Handbook of the Mammals of the World. Vol. 4. Sea Mammals, Lynx Edicions, Barcelona. 2014. 614 p.

FINDS OF SKULLS OF JUVENILE *KURDALAGONUS MAICOPICUS* (CETACEA, CETOTHERIIDAE) IN THE UPPER MIOCENE OF THE REPUBLIC OF ADYGEA

K. K. Tarasenko^{a, #}

Presented by Academician of the RAS A.V. Lopatin

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

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

Fragments of two skulls of young cetotherium baleen whales have been described from the Fortep'yanka 2 locality (Russia, Republic of Adygea, Maikop district, Fortep'yanka river valley, Upper Miocene, Upper Sarmatian, Blinovskaya Formation). Based on the morphology of the posterior (mastoid) process of the petrous bone, the structure of the posterior edge of the temporal fenestra, and the S-shaped shape of the superoccipital ridges, the finds were attributed to *Kurdalagonus maicopicus* (Spasskii, 1951). The proportions of the skull and the degree of closure of the sutures of the skull made it possible to determine the individual age of these whales within a year. New findings significantly complement the data on the structure of the sutures of the lateral wall of the skull and age-related variability of cranial morphology in representatives of the genus *Kurdalagonus*.

Key words: *Kurdalagonus*, Late Miocene, Republic of Adygea, Cetotheriidae, Blinovskaya formation, Middle Sarmatian, Upper Sarmatian

УДК 569.3+551.791

ФАУНА И ЛАНДШАФТЫ ЮЖНО-МИНУСИНСКОЙ ВПАДИНЫ (ЮГ СИБИРИ) В КОНЦЕ ПОЗДНЕГО ПЛЕЙСТОЦЕНА

© 2024 г. Д. Г. Маликов^{1, 2, *}

Представлено академиком РАН И.Ф. Жимулевым

Поступило 06.03.2024 г.

После доработки 25.03.2024 г.

Принято к публикации 30.03.2024 г.

На основании изучения первого в долине р. Абакан местонахождения мамонтовой фауны и сопоставления с другими местонахождениями Южно-Минусинской впадины реконструированы палеоландшафты первой половины MIS 2 или последнего ледникового максимума (LGM). Отложения в изученном геологическом разрезе Уйтаг представлены прослоями алевроитов, подстилаемых и перекрытых дресвой, интерпретируемые как слабо перемытый делювий. Изучение местонахождения Уйтаг, позволило уточнить время и ареалы млекопитающих *Ovis ammon*, *Equus ferus*, *Marmota baibacina*, *Sicista subtilis*, *Lagurus lagurus* и *Microtus gregalis*, а также плейстоценовой птицы *Aquila chrysaetos* на юге Сибири. Возраст местонахождения подтверждается результатами радиоуглеродного датирования. Состав фауны схож с другими местонахождениями региона этого возраста. Все известные местонахождения и единичные находки остатков фауны указывают на широкое развитие открытых остепненных ландшафтов в Южно-Минусинской впадине в период LGM.

Ключевые слова: мамонтовая фауна, поздний плейстоцен, Енисей, Минусинская котловина, палеоландшафты

DOI: 10.31857/S2686738924040037

ВВЕДЕНИЕ

Минусинская межгорная котловина — важный регион для понимания плейстоценовой истории юга Сибири, как с палеонтологической, так и с геологической и археологической точек зрения. Местонахождения млекопитающих позднего плейстоцена распространены на территории Минусинской котловины весьма не равномерно. В большинстве своем они сосредоточены в Северо-Минусинской впадине [1–3], в то время как в Южно-Минусинской впадине такие местонахождения единичны и сильно удалены друг от друга (рис. 1). В последние годы стали появляться данные о новых аллювиальных [4, 5], пещерных [6] и археологических [7, 8] объектах характеризующих фауну позднего плейстоцена региона. Однако этих данных по-прежнему

недостаточно для полноценных реконструкций фауны и условий среды. Особенно скудные данные по геологии и фауне плейстоцена долины р. Абакан. В основном в долине р. Абакан и на ее крупных притоках известны лишь немногочисленные подъемные материалы по палеолиту [9] и редкие находки фаунистических остатков [4]. Настоящая работа посвящена описанию нового геологического разреза верхнечетвертичных отложений, содержащего фаунистические остатки *in situ* в среднем течении р. Абакан, и реконструкции палеоландшафтов на основании обобщения имеющихся данных о фауне времени максимума последнего оледенения — LGM.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Костные остатки крупных млекопитающих и птицы собраны при визуальном осмотре обнажения. Остатки микротериофауны получены при промывке отложений ситом с диаметром ячеек 1 мм. Все собранные костные остатки млекопитающих хранятся в ИГМ СО РАН, без коллекционных номеров. Остатки птицы переданы Н.В. Зеленкову

¹Институт геологии и минералогии им. В.С. Соболева
Сибирского отделения Российской Академии наук,
Новосибирск, Россия

²Институт молекулярной и клеточной биологии
Сибирского отделения Российской Академии наук,
Новосибирск, Россия

*e-mail: dgmalikov@igm.nsc.ru

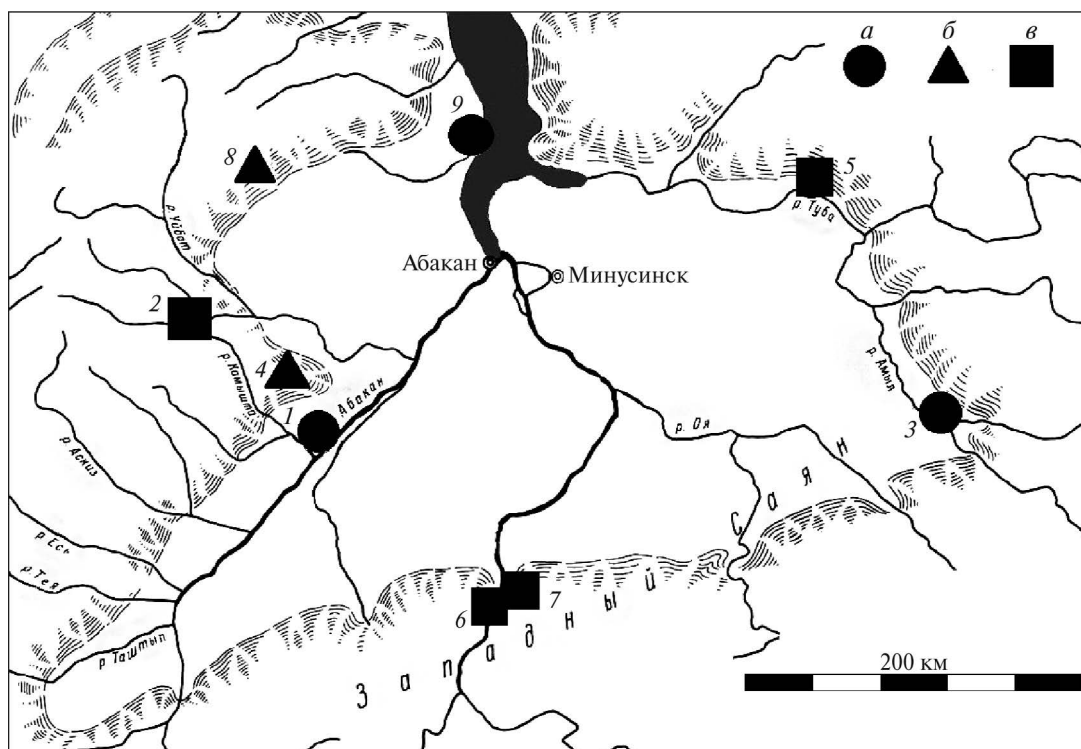


Рис. 1. Основные местонахождения крупных млекопитающих позднего плейстоцена Южно-Минусинской впадины: Типы тафоценозов: а. аллювиальные; б. пещерные; с. палеолитические стоянки. Местонахождения: 1. Уйтаг; 2. Узунжол; 3. Верхний Кужебар; 4. Пещера Фанатиков; 5. Ирба 2; 6. Майна, Уй 1 и 2; 7. Голубая и Сизая; 8. Пещера Заповедная; 9. Мохово

в ПИН РАН, им же сделано определение видовой принадлежности. В общей сложности из местонахождения Уйтаг получено 99 костей минимум от 6 видов млекопитающих и одной птицы (Таблица 1). Радиоуглеродное датирование выполнено в лаборатории ¹⁴CHRONO Centre for Climate, the Environment & Chronology (Queen's University Belfast, UK) на установке MICADAS (Ionplus Mini Carbon Dating System). Пробоподготовка образцов проводилась в соответствии с протоколами данной лаборатории (<http://14chrono.org/radiocarbon-dating/pre-treatment-analysis/>). Радиоуглеродные даты были откалиброваны с использованием программы OxCal 4.4 (<https://c14.arch.ox.ac.uk/oxcal/OxCal.html>) и калибровочной кривой IntCal20 [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Местонахождение располагается в окрестностях памятника природы регионального значения горы Уйтаг (53°18'с.ш., 90°48'в.д.), Аскизского района Республики Хакасия. У южной оконечности горного хребта Уйтаг р. Абакан меандрирует, в результате чего одна из протоков реки подрезает высокую пойму и II надпойменную террасу и вскрывает их отложения.

Здесь в левом борту долины р. Абакан вскрыты отложения террасы высотой 10–12 м. Обнажение представляет собой участок размытой террасы длиной ~500 м (рис. 2), выше и ниже по течению к террасе приключается высокая пойма высотой 6 м.

Терраса имеет двучленное строение, нижние ~7 м представлены переслаиванием светло-серо-желтого алевроита и мелкозернистого песка, а также щебне-дресвянников с валунами представленными в основном обломками пород камышинской

Таблица 1. Фаунистические остатки млекопитающих и птицы из местонахождения Уйтаг

№ п/п	Виды	костей	особей
1	<i>Sicista subtilis</i> Pallas, 1773	1	1
2	<i>Lagurus lagurus</i> Pallas, 1773	14	4
3	<i>Microtus gregalis</i> Pallas, 1779	3	1
4	<i>Marmota baibacina</i> Kastschenko, 1899	73	4
5	<i>Equus ferus</i> Boddaert, 1785	2	1
6	<i>Ovis ammon</i> L., 1758	5	2
7	<i>Aquila chrysaetos</i> L., 1758	1	1
	всего	99	

и самохвальской свит, вскрытых в районе горы Уйтаг [11]. Дресва среднего размера 1–5 см, валуны до 30–40 см, у валунов редко наблюдается горизонтальная ориентация. Верхние ~5 м представлены более мелкозернистым осадком, как у дресвы (валуны редки), так и у заполнителя (песок и алевроит). Слоистость плохо видна. В нижней части разреза алевроит не пористый, в верхней пористый. Прослой песков и алевроитов волнистослоистые, в среднем 10–20 см мощности. Дресва имеет более мощные прослой от 40–60 в нижней, до 10–20 см в верхней части разреза, в верхней части разреза (~5 м), дресва часто залегает линзовидно.

Костные остатки приурочены к верхнему по течению участку обнажения протяженностью около 100 м. Практически все фаунистические остатки обнаружены в разрезе *in situ*, исключение составляет м/с кость лошади и один atlas горного барана. Костные остатки приурочены к прослоям алевроитов подстилаемых и перекрытых дресвой (рис. 3). Остатки, крупных животных — барана, лошади, беркута представлены изолированными костными фрагментами. В отличие от них,

остатки сурков представлены фрагментами скелетов 3 различных особей. Кроме этого встречаются изолированные кости сурков и других грызунов. Находки фрагментов скелетов сурков указывают на то, что палеонтологический материал находится в первичном залегании. С целью установления возраста отложений и фаунистической ассоциации была получена ^{14}C датировка AMS методом, по фрагменту нижней челюсти *O. ammon* [12] обнаруженной в средней части разреза: 19904 ± 117 (UBA-49610), что соответствует возрасту 22.3–21.8 тыс. л. н.

Первые результаты, полученные при изучении местонахождения Уйтаг, позволили уточнить время и ареалы таких видов как *O. ammon*, *E. ferus*, *M. baibacina*, *S. subtilis*, *L. lagurus* и *M. gregalis*. Отдельного внимания заслуживает первая находка плейстоценовой птицы (*Aquila chrysaetos*). Ранее подобные находки в регионе были известны только из пещер и с палеолитических памятников. По совокупности палеонтологических, тафономических и геохронологических данных геологический возраст местонахождения Уйтаг можно определить периодом LGM. Среди фауны присутствуют остатки



Рис. 2. Вид на II надпойменную террасу геологического разреза Уйтаг. Высота рейки 3 м



Рис. 3. Костные остатки в отложениях II надпойменной террасы в разрезе Уйтаг

видов, обитающих исключительно в открытых биотопах степного типа.

По литолого-текстурным особенностям отложения разреза Уйтаг напоминают верхнюю пачку отложений разреза Большая Речка, на Предалтайской равнине [13]. В обоих случаях осадок представлен переслаиванием более грубозернистых отложений (дресва – Уйтаг, грубозернистый песок – Большая Речка), с мелкими алевроитистыми осадками. Слоистость отложений горизонтальная, снизу вверх наблюдается уменьшение размерности зерен осадка. Возраст этой пачки, также как и в случае с отложениями Уйтагского разреза, относится к первой половине MIS 2, на что указывают ^{14}C даты подстилающих отложений – 23080 ± 190 (СОАН-154) и 23300 ± 200 (СОАН-39) [13], что соответствует возрасту 27.8–27.1 тыс. л. н. В.А. Паньчев интерпретирует эти отложения как перигляциальные отложения образованные в тундростепных ландшафтах с разреженной растительностью [14, 15]. По сути, эти отложения интерпретированы как делювиальные отложения, частично переработанные ослабленными речными водотоками. Обычно

перигляциальный аллювий представлен тонкослоистыми песками, без явной дифференциации на русловую и пойменную фации (как например, в разрезе Большая Речка), однако ближе к бортам долин такой аллювий замещается субаэральными образованиями, в том числе склонового ряда [16]. В долине р. Енисей схожие, но мелкозернистые, отложения описаны в разрезах II надпойменной террасы в районе палеолитических стоянок Кокорево I и Черемушка. Перигляциальный аллювий в этих разрезах перекрыт субаэральными отложениями, содержащими остатки палеолитического инвентаря и костей животных, датированными второй половиной сартанского времени: от 12940 ± 270 (РУЛ-256) до 14450 ± 150 (РУЛ-628) на стоянке Кокорево I [17], что соответствует возрасту 18.1–14.4 тыс. л. н.

Тем самым отложения в разрезе Уйтаг не являются в полном смысле отложениями речной террасы, а скорее являются слабоперемытыми делювиальными отложениями в прибрежной части реки. Приведенные ниже данные по реконструкции палеоландшафтов не противоречат

такой интерпретации отложений, как и находки фрагментов скелетов сурков в положении *in situ*. Отсутствие следов роющей деятельности грызунов, а также ископаемых почв, можно рассматривать в качестве дополнительного аргумента в пользу аквального, а не субаэрального генезиса отложений.

Ближайшим возрастным и территориальным аналогом фауны местонахождения Уйтаг является фауна с палеолитической стоянки Уй I в Западном Саяне [18], датируемая возрастным интервалом 23.8–19.9 тыс. л. н. (с учетом дат по почве до 28 тыс. л. н.). На стоянке Уй I существенную долю фаунистических остатков занимают кости плейстоценового кулана (*E. hemionus* Pallas, 1775), однозначно указывающие на степные местообитания в окрестностях памятника, что также подтверждают и остатки зайца толая (*Lepus tolai* Pallas, 1778). Авторы статьи [18] считают, что районом добычи этих видов была территория Минусинских степей (в частности Койбальской). Помимо этого, на стоянке Уй I также найдены остатки *Vulpes vulpes* L., 1758, *Equus* sp., *Cervus elaphus* L., 1758, *Bison priscus* Bojanus, 1827, *Bos* sp., *Capra sibirica* Pallas, 1776 и *Ovis ammon*, которые могли быть добыты непосредственно в горном окружении стоянки.

Пещера Заповедная, расположенная в 70 км севернее местонахождения Уйтаг, также содержит фауну схожего временного интервала 21.8–19.9 тыс. л. н., что также соответствует первой половине MIS 2. Для плейстоценовых отложений определено 13 видов млекопитающих, представленных преимущественно степными видами (суслик, сурок, сайгак, лошадь и др.) с присутствием лесных и горных (соболь, бурый медведь, козерог) видов животных. В то же время не установлен точный хронологический интервал плейстоценовой фаунистической ассоциации, так как ^{14}C дата 17200 ± 340 (COAH-9817) была получена по рогу *Megaloceros giganteus* Blumenbach, 1799 из верхней части слоя 5 [6], тогда как материал из слоя 6 не был датирован. Таким образом, вероятно, не весь плейстоценовый комплекс относится к первой половине MIS 2.

Еще одно местонахождение, содержащее фауну схожего возраста, расположено в северной части Южно-Минусинской впадины, в долине р. Биджа. Фауна крупных и мелких млекопитающих, обнаруженная в местонахождении Мохово, указывает на широкое развитие степных и лесостепных ландшафтов [5]. Изначально для местонахождения предполагался позднекаргинский возраст (конец MIS 3), однако новая ^{14}C датировка 20894 ± 133 (UBA-49608), полученная по остаткам *Saiga tatarica* L., 1766 [12], подтверждает, что ранее полученная дата 23160 ± 235 (NSKA-02068) по черепу *Ovis ammon* не является омоложенной, как это предполагалось изначально [5]. Таким образом,

местонахождение Мохово содержит материал из несколько большего хронологического интервала (27.8–22.9 тыс. л. н.), чем местонахождения Уйтаг, Уй I и п. Заповедная. Но все они позволяют охарактеризовать фауну, населявшую регион в первой половине MIS 2.

Все это позволяет довольно уверенно реконструировать широкое распространение открытых остепненных ландшафтов в Южно-Минусинской впадине в первую половину MIS 2. С этим соотносится находка фрагмента черепа сайгака в окрестностях с. Аскиз, возраст которой 23.4 тыс. л. н. [19], а также не многочисленные находки остатков шерстистого мамонта (23.5 и 21.8 тыс. л. н.) в этой впадине и единственная находка остатков овцебыка (24.9 тыс. л. н.) в регионе [12]. Еще одним геологическим подтверждением развития открытых остепненных ландшафтов в Южно-Минусинской впадине в первую половину MIS 2 можно считать отсутствие субаэрального чехла на отложениях II надпойменной террасы в местонахождении Уйтаг. Такая картина характерна для всей западной части Минусинской котловины и обусловлена эоловой денудацией территории под действием западных ветров [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучено первое аллювиальное местонахождение ископаемых млекопитающих в долине р. Абакан, на территории Южно-Минусинской впадины. Местонахождение приурочено к отложениям II надпойменной террасы р. Абакан. Отложения представлены прослоями алевроитов, подстилаемых и перекрытых дресвой, интерпретируемые как слабо перемытые делювиальные отложения. Первые результаты, полученные при изучении местонахождения Уйтаг, позволили уточнить время и ареал таких видов, как *O. ammon*, *E. ferus*, *M. baibacina*, *S. subtilis*, *L. lagurus* и *M. gregalis*. Отдельного внимания заслуживает первая находка плейстоценовой птицы (*Aquila chrysaetos*) в аллювиальных отложениях региона. Ранее подобные находки в регионе были известны только из пещер и с палеолитических памятников.

На основании радиоуглеродной датировки, полученной по челюсти *O. ammon*, возраст местонахождения определяется первой половиной MIS 2 или LGM. Состав фауны схож с другими местонахождениями региона этого возраста. Наблюдаемые небольшие различия в фаунах в первую очередь обусловлены малой выборкой палеонтологического материала в местонахождении Уйтаг. Кроме того, отсутствие лесных видов может быть связано с большей удаленностью местонахождения от гор, где могли быть развиты такие типы ландшафтов. Все известные местонахождения

и единичные находки остатков фауны указывают на широкое развитие открытых остепненных ландшафтов в Южно-Минусинской впадине в период LGM.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность Н.В. Зеленкову (ПИН РАН) за определение остатков птицы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Сбор материала осуществлялся в рамках государственного задания ИГМ СО РАН №122041400243-9. Изучение фауны, палеоландшафтные реконструкции и интерпретация данных проведены по гранту Российского научного фонда, проект № 23-74-10060, <https://rscf.ru/project/23-74-10060/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

В работе отсутствуют эксперименты с людьми и живыми животными.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что у него нет известных финансовых интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Оводов Н.Д. Древние звери Хакасии // Астроархеология – естественно-научный инструмент познания протокультур и астральных религий жречества древних культур Хакасии. Красноярск, 2009. С. 189–199.
2. Шпанский А.В., Маликов Д.Г. Новые местонахождения четвертичных млекопитающих в междуречье рек Белый и Черный Июс, Республика Хакасия // Вестник Томского государственного университета. 2015. №396. С. 245–257.
3. Маликов Д.Г., Вольвах А.О., Вольвах Н.Е., и др. Черноусов лог – новое местонахождение ископаемых млекопитающих в Минусинской котловине (Геологическое строение и условия формирования) // Геология и минерально-сырьевые ресурсы Сибири. 2023. №1. С. 12–20.
4. Маликов Д.Г. Крупные млекопитающие среднего-позднего неоплейстоцена Минусинской котловины, стратиграфическое значение и палеозоогеография. Дисс. ... канд. геол.-минер. наук. Томск, 2015.
5. Маликов Д.Г. Строение I надпойменной террасы в нижнем течении р. Биджа (Южно-Минусинская впадина) и новые данные по фауне местонахождения Мохово // Геосферные исследования. 2020. № 2. С. 6–15.
6. Маликов Д.Г., Митченко А.М. Пещера Заповедная – новое местонахождение плейстоцен-голоценовой фауны млекопитающих в Минусинской котловине (Южная Сибирь) // Геосферные исследования. 2022. № 1. С. 87–97.
7. Поляков А.В., Амзараков П.Б., Васильев С.А., и др. Стоянка финального палеолита Ирба-2 в предгорьях Саян (предварительные итоги исследований) // Stratum plus. 2018. №1. С. 383–401.
8. Васильев С.А. Поздний палеолит Южно-Минусинской котловины и ее горного окружения: итоги и проблемы // Археология, этнография и антропология Евразии. 2023. Т. 51, №3. С. 124–129.
9. Абрамова З.А. Астахов С.Н., Васильев С.А., и др. Палеолит Енисея. Л.: Наука, 1991.
10. Reimer P., Austin W., Bard E., et al. The IntCal20 Northern Hemisphere radiocarbon age calibration curve (0 –55 cal kBP) // Radiocarbon. 2020. V. 62, N4. P. 725–757.
11. Филимонов А.Н. Флора, стратиграфия и палеогеография верхнего девона и нижнего карбона (турне) Южно-Минусинской впадины. Дисс. ... канд. геол.-минер. наук. Томск, 2014.
12. Malikov D.G., Svyatko S.V., Pyrayev A.N. Paleoeecology of the mammoth fauna of Southern Siberia in Last Glacial period based on stable isotope data // Quaternary International. 2023. V. 674–675. P. 49–61.
13. Панычев В.А. Радиоуглеродная хронология аллювиальных отложений Предалтайской равнины. Новосибирск: Наука, 1979.
14. Шанцер Е.В. Очерки учения о генетических типах континентальных осадочных образований. Тр. Геол. ин-та АН СССР; Вып. 161. М.: Наука, 1966.
15. Холмовой Г.В. О влиянии на строение аллювия различных стадий перигляциального режима // Бюллетень комиссии по изучению четвертичного периода. 1988. №57. С. 90–100.
16. Астахов В.И. Четвертичная геология суши: учеб. пособие. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2020.
17. Цейтлин С.М. Геология палеолита Северной Азии. М.: Наука, 1979.
18. Васильев С.А., Каспаров А.К., Свеженцев Ю.С. Фаунистические остатки и реконструкция характера охоты палеолитического человека на Верхнем Енисее: по материалам многослойных стоянок в районе Майнинской ГЭС // Археология, этнография и антропология Евразии. 2001. №3. С. 26–30.
19. Jürgensen J., Drucker D.G., Stuart A.J., et al. Diet and habitat of the saiga antelope during the late

- Quaternary using stable carbon and nitrogen isotope ratios // *Quaternary Science Reviews*. 2017. V. 160. P. 150–161.
20. Дроздов Н.И., Чеха В.П. Реконструкция климатов позднего плейстоцена Средней Сибири (бассейн

Енисея) по данным изучения лессовой формации // Проблемы реконструкции климата и природной среды голоцена и плейстоцена Сибири. Новосибирск: Изд-во Института археологии и этнографии СО РАН; 2000. Вып. 2. С. 175–188.

FAUNA AND LANDSCAPES OF THE SOUTHERN MINUSINSK BASIN (SOUTHERN SIBERIA) AT THE END OF THE LATE PLEISTOCENE

D. G. Malikov^{a, b, #}

Presented by Academician of the RAS I.F. Zhimulev

^a*Sobolev Institute of Geology and Mineralogy, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russian Federation*

^b*Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russian Federation*

[#]*e-mail: dgmalikov@igm.nsc.ru*

The paleolandscapes of the first half of MIS 2 or the Last Glacial Maximum (LGM) were reconstructed based on the study of the first mammoth fauna locality in the Abakan River valley and comparison with other localities in the South Minusinsk Basin. The sediments in the geological section of Uyttag are represented by interlayers of silts, underlain and overlain by sandstone rock slack fragment, interpreted as weakly eroded deluvium. The study of the Uyttag locality made it possible to clarify the time and range of distribution in southern Siberia of some mammal species *Ovis ammon*, *Equus ferus*, *Marmota baibacina*, *Sicista subtilis*, *Lagurus lagurus* and *Microtus gregalis*, as well as Pleistocene bird *Aquila chrysaetos*. The age of the locality is confirmed by radiocarbon dating. The species composition of the fauna is similar to other localities in the region of this age. All known localities and single finds of faunal remains indicate a wide development of open steppe landscapes in the South Minusinsk Basin during the LGM.

Keywords: mammoth fauna, Late Pleistocene, Yenisei River, Minusinsk Depression, paleolandscapes

УДК: 591.4+59.82+599.735.31

ВОЛОСЯНОЙ ПОКРОВ ВОДЯНОГО ОЛЕНЯ *HYDROPOTES INERMIS* (CERVIDAE, ARTIODACTYLA) – НОВОГО ВИДА В ФАУНЕ РОССИИ

© 2024 г. О. Ф. Чернова^{1, *}, Е. М. Щелканов²

Представлено академиком РАН В.В. Рожновым

Поступило 18.03.2024 г.

После доработки 09.04.2024 г.

Принято к публикации 12.04.2024 г.

Впервые с помощью световой и сканирующей электронной микроскопии изучен волосяной покров и микроструктура волос взрослого самца *Hydropotes inermis* из Приморского края России. Отсутствие обильной подпуши, редкая шерсть и ее слабая ярусность характерны для этого обитателя умеренной муссонной и тропической зон, который не нуждается в эффективной теплозащите. Ячеистая и сетчатая сердцевина волос сходна с таковой у других оленей, хорошо развита, повышает теплозащитные свойства волос, так как сезонные, суточные колебания температуры и влажности могут быть значительными. Орнамент кутикулы сходен с таковым у оленей триб *Alceini* и *Capreolini*. Шерсть служит водяному оленю надежной защитой от механических повреждений при передвижениях в зарослях кустарников и трав по берегам рек и болот в биотопах, которые этот олень населяет, чему способствует значительные толщина и длина волос на спине, боках и бедрах. Узловатость волос предохраняет кожу оленя от острых выростов водных и болотных растений.

Ключевые слова: водяной олень, волосы, микроструктура, сканирующая электронная микроскопия, сравнительная морфология, адаптации, Приморский край

DOI: 10.31857/S2686738924040047

Водяной олень (*Hydropotes inermis* Swinhoe, 1870) – единственный представитель рода водяных оленей, включающий два подвида: китайский (*H. i. inermis* Swinhoe, 1870), который населяет Великую Китайскую равнину – дельтовую низменность и восточную часть бассейна нижнего течения р. Янцзы, а также острова архипелага Чжоушань [1]; ареал корейского подвида (*H. i. argyropus* Heude, 1884) занимает практически всю Южную Корею и значительную часть Северной Кореи [1, 2].

Водяной олень включен в список редких и исчезающих видов Международного союза и южную часть российского Приморья охраны природы (МСОП) в категории “уязвимый вид” [3]. Китайский подвид находится под угрозой исчезновения, насчитывая несколько сотен особей. Корейский подвид гораздо более многочислен (примерно 700 тыс. особей) и даже рассматривается как “вид,

наносящий вред сельскому хозяйству” [4]. В Российской Федерации корейский подвид внесен в Красную Книгу Приморского края [5].

Первое достоверное сообщение о корейском водяном олене на территории России зарегистрировано в 2019 г. [6]: одна особь была заснята фотоловушкой, установленной на южном участке национального парка “Земля леопарда” (Хасанский р-он Приморского края) (рис. 1а). Дальнейшие исследования показали, что хасанская популяция состоит примерно из 150 особей [7, 8]. Поскольку водяной олень обладает наиболее высоким репродуктивным потенциалом среди оленевых (Cervidae Goldfuss, 1820) (фертильность самок наступает в 7–8 мес., и они способны ежегодно приносить до шести детенышей [2]), можно ожидать быстрое распространение вида на юге Приморья. Возможно, он даже заменит диких кабанов (*Sus scrofa* L., 1758) в рационе амурских тигров (*Panthera tigris altaica* Temminck, 1844) и дальневосточных леопардов (*Panthera pardus orientalis* Schlegel, 1857), так как численность кабанов существенно снизилась в этом регионе вследствие эпизоотии африканской чумы свиней [9].

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

²Государственный университет просвещения, Московская обл., г. Мытищи, Россия

*e-mail: olga.chernova.moscow@gmail.com

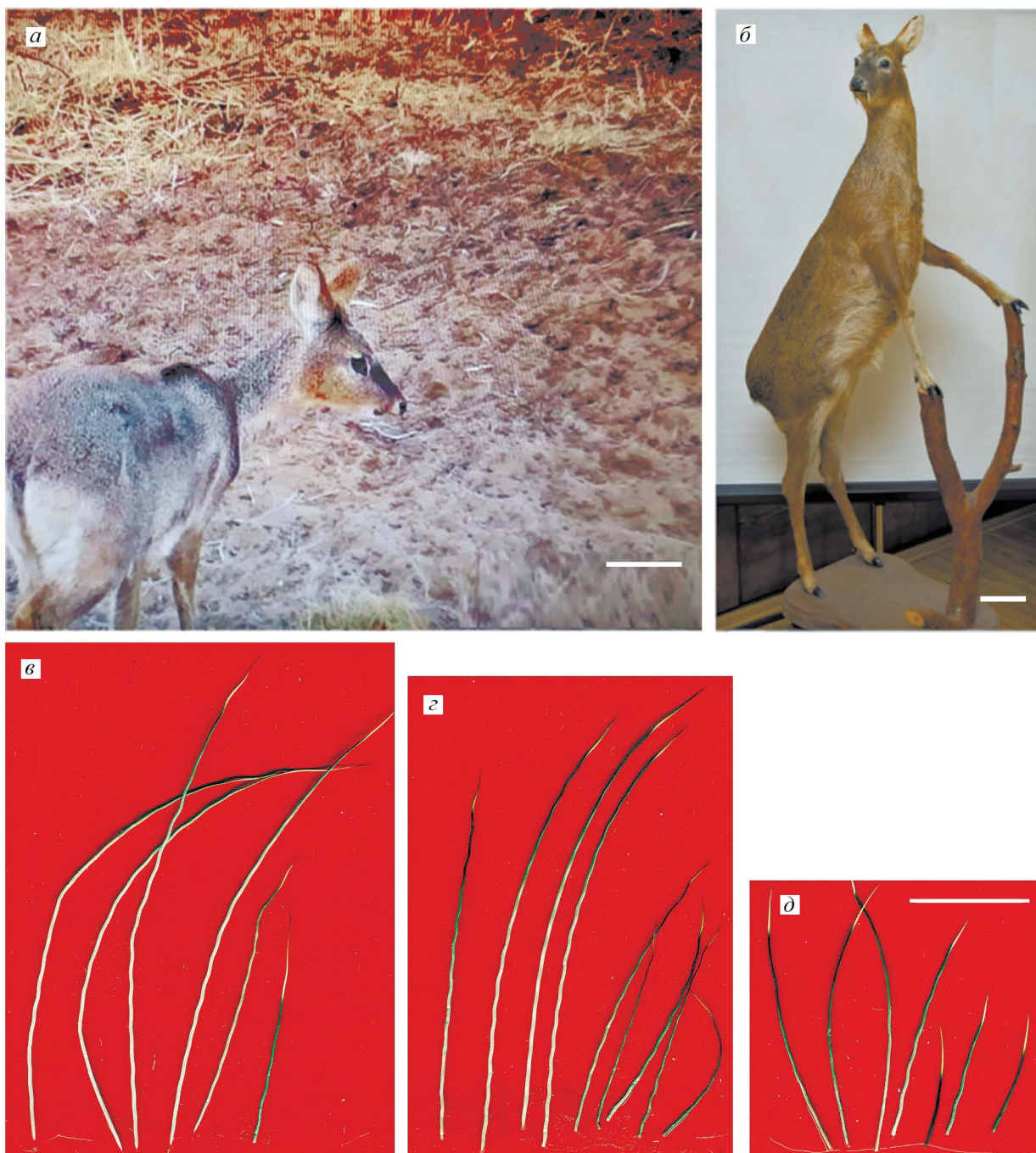


Рис. 1. Внешний вид взрослых особей *Hydropotes inermis* и профиль волос. (а) — снимок получен с помощью фото-ловушки (апрель 2019 г.) в природном парке краевого значения “Хасанский” Роспотребнадзора (г. Владивосток). Фото любезно предоставлено Д.В. Панкратовым и Ю.А. Дарманом. (б) — чучело из зоологической экспозиции НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора; колл. номер FE-5913. Сканированное изображение (HP Laser Jet 1320, 300 dpi) волос: (в) — подхвостовые, (г) — спины, (д) — груди. Хорошо заметна узловатость и зонарная окраска волос. Масштаб: а, б — 10 см; в–д — 10 мм.

Водяной олень — единственный вид семейства оленевых, у которого самцы лишены рогов. Туловище короткое с маленькой вытянутой головой, короткой шеей, большими ушами. Масса тела

взрослых особей 12–20 кг, длина туловища 65–80 см. Хвост короткий, передние конечности заметно короче задних (рис. 1а, б). Копыта подвижные, легко раздвигаются в стороны, и между ними

имеется перепонка. Зубная формула: I 0/4, C 1/0, P 3/3, M $3/3 \times 2 = 34$. Из-под верхней губы самцов и самок водяного оленя выступают саблевидные светлые клыки (рис. 16). Из специфических кожных желез развиты небольшие предглазничные, паховые (единственный случай среди оленей) и межпальцевые на стопе [10]. Предполагают, что покровы корейского водяного оленя способствуют снижению уровня инвазии иксодовых клещей (Parasitiformes: Ixodida, Ixodidae) по сравнению с обитающей в том же регионе сибирской косулей (*Capreolus pygargus* Pallas, 1777) благодаря обильному кровоснабжению кожи, гипертрофии кожных желез, разнообразию кутикулы остевых волос, которые в 2.83 раза толще и прочнее, чем у косули, но не длиннее [11]. Однако нельзя исключать, что водяные олени, обитающие в более влажных биотопах, меньше контактируют с клещами.

Цель настоящей работы состоит в проведении сравнительного морфологического анализа микроструктуры водяного оленя для выявления видовой специфики и адаптивных свойств его шерсти.

Мы получили образцы волос с разных участков тела (табл. 1) чучела взрослого самца корейского водяного оленя (рис. 16), добытого в 2019 г. в Хасанском р-не Приморского края, из зоологической экспозиции НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора (г. Владивосток), колл. № 5913. Для сравнения мы выбрали индийского мунтжака (*Muntiacus muntjak* Zimmermann, 1780), привлекли сведения из литературных источников [12, 13] и собственные данные о микроструктуре волос разных видов Cervidae [14–16]: водяной олень вместе с сибирской косулей и лосем (*Alces alces* L., 1758) входит в кладу Odocolinae подсемейства Alceinae (= Odocolinae) (олени Старого Света) [17]; по филогенетическим и кариотипическим характеристикам водяной олень и косуля относят к подсемейству Capriolinae [18].

Изучение волос проводили с применением морфометрии, световой (Keyence Bioevo BZ-9000, Япония) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (Vega TS5130MM, Tescan, Чехия). Примеры получали в программе ImageJ. Описательная статистика данных сформирована в программе STATISTICA 10 (StatSoft, США). Электронные изображения редактировали в программе Adobe Photoshop Elements 11 (США).

Полиморфность шерсти. Окрас шерсти водяного оленя изменяется от желто-бурого до светло- или темно-рыже-бурого летом, и темно-бурого зимой, брюхо светлее спины, короткие уши и хвост густо покрыты волосами. Нами показано, что такой окрас шерсти определяется разнообразием окраса отдельных волос, которые на разных участках тела могут быть однотонными светлыми или иметь зонную окраску – широкий темный поясик в верхней трети стержня и светлый острый кончик, что

придает шерсти пестроту (рис. 1в–д). Шерсть в основном двухярусная (рис. 1в–д), разнообразие растущих поодиночке волос невелико, в основном это остевые волосы трех размерных порядков (ости I, II и III) (табл. 1). Грубые прямые и толстые направляющие волосы (ворс) отсутствуют, а тонкие слабо извитые пуховые волосы найдены в единичных пробах в виде неплотных комков (табл. 1). Степень полиморфности волосяного покрова водяного оленя отличается от таковой у мунтжака, волосы которого, хотя и растут поодиночке, но могут быть собраны в группы по три в каждой, ости I шести размерных порядков, а стержень волоса прямой. Основной отличительной чертой остей водяного оленя служит мелкая волнистость цилиндрического стержня, на нем располагается до семи–девяти небольших изгибов, которые тактильно ощущаются как узелковые утолщения (рис. 1в–д), что не выражено у других видов оленей, у которых волосы волнисты за счет сужений и перетяжек [14]. Профиль остевых волос арочный, они дугообразно изогнуты к вершине, а стержень постепенно утолщается от основания к верхней трети волоса, без выраженного расширения. Основание стержня имеет вид очень тонкой и длинной “ножки”, резко переходящей в расширение стержня (рис. 2д). Ножка присутствует у волос, например, сибирской косули, но у других оленей – европейской косули (*Capreolus capreolus* L., 1758), пятнистого оленя (*Cervus nippon* Temminck, 1838), благородного оленя (*Cervus elaphus* L., 1758), лося – ножка остей короткая или отсутствует [15].

Длина волос сильно изменяется в разных участках тела водяного оленя, и наиболее длинные ости I покрывают спину, а также крестец, подмышки, бедра и хвост. Максимальной длины ости I достигают на субкаудальной коже, где, видимо, связаны со специфической железой; самые короткие волосы обнаружены на ушной раковине и между пальцами стопы (табл., рис. 3а). Ости II нижнего яруса шерсти в целом демонстрируют сходное изменение длины, за исключением межпальцевой кожи, где они становятся длиннее ости I, что обеспечивает их участие в распространении пахучего секрета межпальцевой железы. Длина остей I холки или спины у сравниваемых видов оленей по данным разных авторов составляет в среднем 19.2 мм у мунтжака, 38.3 мм у сибирской косули, 38.4 мм у сибирской кабарги (*Moschus moschiferus* L., 1758), 45.8 мм у благородного оленя и 158.8 мм у лося [11, 14, 15]. Таким образом, у водяного оленя длина волос на холке и спине (36.3 мм и 48.8 мм соответственно) сходна с таковой у косули, кабарги и благородного оленя.

В связи с узловатым строением волос водяного оленя их толщина не уравнена и сильно колеблется, но в среднем ости I толще остей II (табл. 1, рис. 3б). Самые толстые ости I растут на спине, бедре и под хвостом. Толщина остей II нижнего

Таблица 1. Промеры остевых волос взрослого самца *Hydropotes inermis argyropus* ($M \pm m$, σ , $n = 4$, $\lim$)*

Расположение волос на теле животного	Категория волос	Длина волос, мм	Толщина		Структура сердцевины	
			волоса, мкм	сердцевины, % толщины волоса, $\lim$	альвеолярная	сетчатая
Перед глазом	Ость I	3.5 ± 0.5 $\sigma = 0.7$	143.1 ± 34.5 $\sigma = 1191.8$	59–75	+	+
Ухо	Ость I	21.0 ± 1.4 $\sigma = 2.7$	146.9 ± 11.3 $\sigma = 127.7$	69–74	+	
	Ость II	15.0 ± 1.3 $\sigma = 1.9$	79.1 ± 11.3 $\sigma = 127.7$	75–80	+	
	Ость III	10.0 ± 1.2 $\sigma = 1.5$	79.1 ± 11.3 $\sigma = 127.7$	63–71	+	
	Пух	19.8 ± 4.2 $\sigma = 18.0$	42.5 ± 3.5 $\sigma = 12.5$	Отсутствует		
Холка	Ость I	36.3 ± 4.2 $\sigma = 17.3$	307.9 ± 81.1 $\sigma = 6586.7$	93–96	+	
	Ость II	21.0 ± 3.5 $\sigma = 12.7$	174.0 ± 73.5 $\sigma = 5797$	82–89	+	
Спина	Ость I	48.8 ± 5.2 $\sigma = 27.2$	440.5 ± 16.0 $\sigma = 255.4$	89–90	+	
	Ость II	31.1 ± 1.6 $\sigma = 2.5$	310.7 ± 39.9 $\sigma = 1596.1$	86–91	+	
	Пух	Скомкан	13.7 ± 28.4 $\sigma = 18.0$	Отсутствует		
Грудь	Ость I	29.7 ± 7.5 $\sigma = 56.2$	365.5 ± 39.9 $\sigma = 806.7$	95–97	+	
	Ость II	15.9 ± 5.3 $\sigma = 27.9$	282.5 ± 79.9 $\sigma = 6384.5$	74–90	+	
Брюхо	Ость I	33.2 ± 3.4 $\sigma = 3.4$	322.0 ± 14.6 $\sigma = 212.8$	95–96	+	
	Ость II	24.9 ± 6.5 $\sigma = 41.8$	61.8 ± 8.0 $\sigma = 63.8$	80–91	+	
Под хвостом	Ость I	56.9 ± 6.3 $\sigma = 40.0$	433.3 ± 17.6 $\sigma = 308.7$	90–92	+	
	Ость II	27.2 ± 6.4 $\sigma = 41.3$	364.4 ± 25.0 $\sigma = 627.8$	64–96	+	
Хвост	Ость I	57.8 ± 8.9 $\sigma = 79.8$	270.9 ± 18.7 $\sigma = 349.6$	91–98	+	
	Ость II	21.5 ± 3.0 $\sigma = 9.2$	241.7 ± 17.3 $\sigma = 297.9$	81–82	+	
	Пух	Скомкан	19.8 ± 4.2 $\sigma = 18.0$	Отсутствует		
Бедро	Ость I	47.5 ± 3.5 $\sigma = 12.5$	321.5 ± 23.3 $\sigma = 541.2$	93–94	+	
	Ость II	26.0 ± 5.7 $\sigma = 32.8$	195.9 ± 28.4 $\sigma = 808.7$	75–81	+	
Голень	Ость I	17.5 ± 0.7 $\sigma = 0.5$	62.0 ± 8.5 $\sigma = 72.0$	70–89	+	+
	Ость II	39.5 ± 7.8 $\sigma = 60.5$	27.5 ± 7.1 $\sigma = 50.0$	47–72		+ перегородки с перфорациями
	Пух	Скомкан	19.8 ± 4.2 $\sigma = 18.0$	Отсутствует		
Межпальцевый карман	Ость I	11.0 ± 1.4 $\sigma = 2.0$	124.6 ± 11.8 $\sigma = 139.3$	30–35	Фрагментарная, комковатая, черная	

* Примечание. $M \pm m$ – среднее арифметическое и ошибка математического ожидания; σ – дисперсия; n – число промеров на каждом препарате четырех волос; $\lim$ – пределы измерения; знаком «+» обозначено присутствие сердцевины.

яруса меньше, но варьирует сходно в разных участках кожи. Сравнение толщины волос холки и спины водяного оленя по нашим данным (307.9–440.5 мкм) (629 мкм по [11]) с таковыми у других оленей по данным разных авторов [11, 14–16] показывает, что она гораздо больше, чем у мунтжака (130 мкм), косули (146; 286 мкм), благородного оленя (199 мкм), и сходна или даже больше, чем у лося (551 мкм). Таким образом, некрупный водяной олень обладает очень толстыми и длинными волосами, надежно защищающими спину, бок и бедра. Можно полагать, что и кожа на этих участках тела также утолщена и отличается обилием кожных желез, тем более что у родственной ему сибирской косули, имеющей сходные размеры, развит “кожный щит”, покрывающий переднюю часть головы и туловища [19].

Степень развития и микроструктура сердцевины. Сердцевина отсутствует в ножке волоса и кончике стержня, но сильно развита в срединной части волоса, особенно в осях I туловища, в которых занимает до 96% толщины стержня (табл. 1). Она слабее представлена в осях II и III, а менее всего в волосах голени и между пальцами (30–35%), где сердцевина дистрофичная – прерывистая, комковатая, сильно пигментированная. Степень развития сердцевины в волосах холки и спины водяного оленя вполне сходна с таковой у других оленей: сибирской косули – 95.7%, сибирской кабарги – 98%, благородного оленя – 91.4%, лося – 96.7% [14], но больше, чем у мунтжака – 75% [15]. Сердцевина волос ячеистая (альвеолярная) или сетчатая (табл.), но у сетчатой сердцевины размеры воздушных полостей сильно варьируют: более мелкие ячейки занимают периферическое положение в стержне, а самые крупные лежат в центральной его части (рис. 2а, б, в, г). Например, на холке в осях I площадь ячеек на продольном сечении стержня изменяется почти в 12 раз, от 355.9 мкм² до 4377.8 мкм². Форма ячеек меняется от округлой и овальной до прямоугольной в периферической части сердцевинного тяжа и неправильной овальной в его центральной части. Перегородки между полостями тонкие пленочные неперфорированные у волос туловища, но перфорированные у волос голени, без пигментных гранул, что типично для оленей. Ближе к тонкому кончику волоса сердцевина становится однорядной лестничной – ее тонкие перегородки вытянуты поперек сердцевинного тяжа. Микроструктура сердцевины волос водяного оленя вполне сходна с таковой у других оленей, особенно у сибирской кабарги и сибирской косули [16].

Орнамент черепичной кутикулы незначительно варьирует по всему стержню: на тонких участках стержня (выше корня и на кончике) кутикула лентовидная (одна чешуйка полностью оборачивает стержень) с волнистым апикальным свободным краем (рис. 2д, е), но для основной части стержня характерна вытянутая поперек стержня, ромбовидная

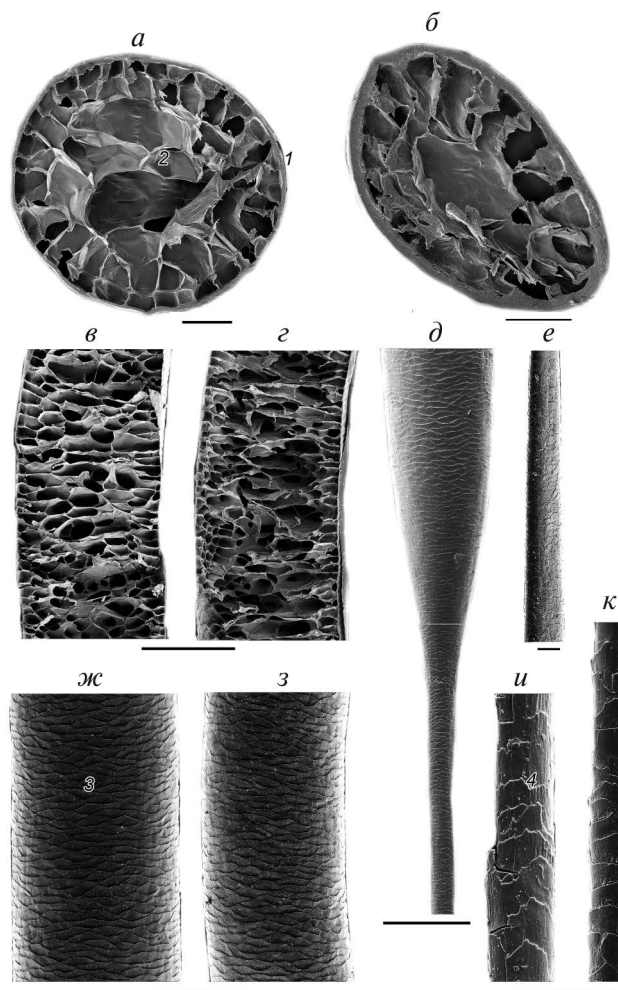


Рис. 2. Микроструктура остевого волоса спины взрослого самца *Hydropotes inermis*: (а)(б) – поперечное сечение изогнутого волоса соответственно в его середине и выше; (в)(г) – продольное сечение середины изогнутого волоса; (д) – тонкая “ножка” волоса с резким расширением стержня и выше; (ж)(з) – кутикула соответственно середины изогнутого волоса и выше; (е)(и) (к) – вершина волоса: 1 – кора, 2 – сердцевина, воздушные полости и перегородки, 3 – черепичная волнистая кутикула, 4 – кольцевидная кутикула. Данные СЭМ. Масштаб: а, б – 50 мкм; в, г, ж, з – 200 мкм; д, е, и, к – 20 мкм.

форма невысоких выростов чешуек или отдельных чешуек, формирующая нежный орнамент, подобный мелкой ряби на воде (рис. 2ж, з). На кончике волос грубые чешуйки с обломанным апикальным краем образуют раструбный орнамент (рис. 2и, к). Максимальная высота волнистых чешуек в срединной части стержня изменяется в волосах туловища от 20.7 ± 4.2 мкм на спине до 22.0 ± 3.6 мкм на брюхе, но на волосах под хвостом достигает 25.0 ± 4.6 мкм. Высота чешуек, вычисленная относительно толщины стержня в коже перед глазом, на туловище, бедре и голени изменяется

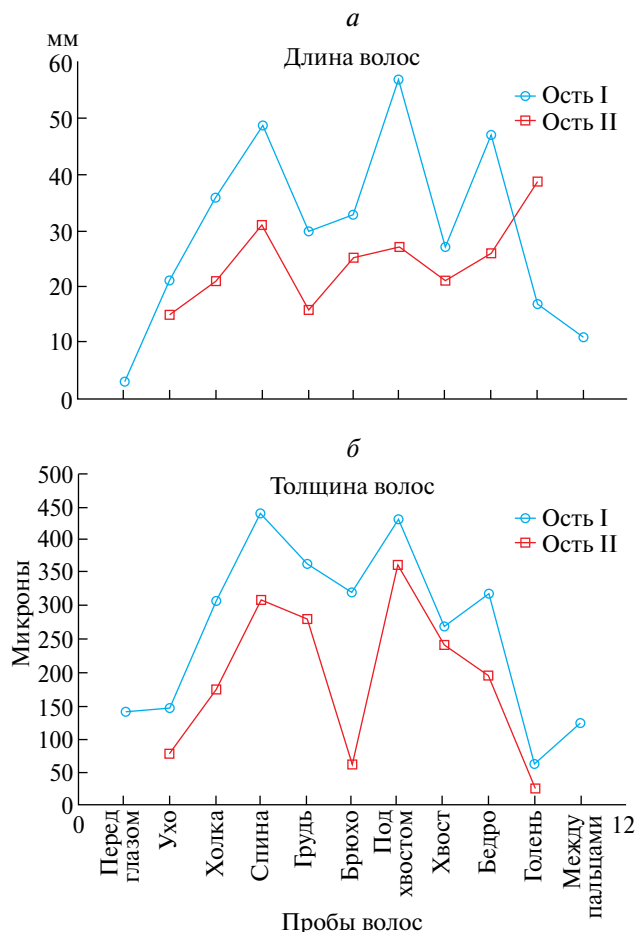


Рис. 3. Промеры волос взрослого самца *Hydropotes inermis* из разных участков тела. (а) — длина волос, мм. (б) — толщина волос, мкм.

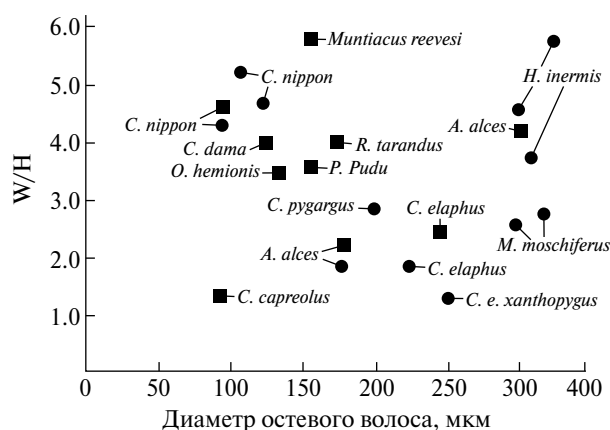


Рис. 4. Матрица коррелятивных связей между диаметром ости I и отношением ширины чешуйки кутикулы (поперек стержня) к ее высоте (вдоль стержня) (W/H) у Cervidae: ■ — данные по [17, fig. 2]; ● — данные по [16] и оригинальные данные (n = 4 для каждого случая).

от 0.05 до 0.09, но на более тонких волосах уха и между пальцами чешуйки крупнее (0.2–0.3), т.е. чем толще волос, тем мельче чешуйки.

Орнамент кутикулы водяного оленя вполне сходен с таковым у других представителей подсемейства Alceinae (лося, сибирской косули) и семейства Moschidae (сибирской кабарги), но отличается от такового у мунтжака и оленей родов *Rangifer*, *Odocoileus*, *Cervus*, *Mazama* [15, 16]. Однако на остовом волосе у североамериканского благородного оленя (вапити) все же имеется небольшой участок сходной ромбовидной кутикулы [15]. Ромбовидный орнамент может служить отличительным признаком видов подсемейства Alceinae, включая водяного оленя. У мунтжака рисунок кутикулы значительно отличается от такового у других оленей, он изменяется по стержню: у основания стержня свободные края длинных чешуй проходят под углом 45° к поперечной оси волоса, высота чешуи непостоянна; в срединной части стержня размеры чешуек сильно варьируют, а края имеют глубокие зазубрины. Различия в орнаменте кутикулы и профиля волос мунтжака и указанных выше оленей вполне закономерно, так как первого выделяют вместе с хохлатым оленем (*Elaphodus cephalophus* Milne-Edwards, 1872) в отдельное подсемейство Cervulinae [20]. Относительные характеристики кутикулы волос разных видов оленей демонстрируют обособленность европейской косули, сибирской кабарги, мунтжака и водяного оленя от основной группы видов рода *Cervus* (рис. 4), что также вполне совпадает с таксономией инфраотряда Racoa [20].

Нами показано, что водяной олень по особенностям строения шерсти и микроструктуры волос, безусловно, сходен с родственными видами, относящимися к подсемейству Alceinae, отличается от представителей подсемейств Cervulinae и Cervinae, но имеет черты сходства с сибирской кабаргой (Moshinae). Относительные индексы волос разных видов оленей отделяют косулю, кабаргу, мунтжака и водяного оленя от основной группы видов родов *Cervus*, *Odocoileus*, *Pudu* и *Rangifer* (рис. 4).

Отсутствие обильной подпуши, слабая яркость шерсти характерны для водяного оленя как обитателя умеренной муссонной и тропической зон, который не нуждается в мощной теплой шерсти с подпушью. Вместе с тем сердцевина его волос также хорошо развита, как и у других оленей, что повышает теплозащитные свойства шерсти, так как сезонные и суточные колебания температуры и влажности могут быть значительными. У водяного оленя шерсть служит надежным защитным покровом от повреждений при передвижениях в зарослях кустарников и трав по берегам рек и болот в биотопах, которые он населяет. Это объясняет значительную толщину и длину волос на спинной и боковой частях тела и бедрах. Узловатость волос препятствует доступу острых выростов водных и болотных

растений к коже оленя. Отмеченная у водяного оленя гипертрофия кожных желез [11] связана, прежде всего, с необходимостью защиты от излишней влаги и с особенностями терморегуляции.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования микроструктуры волос проведены в Центре коллективного пользования “Инструментальные методы в экологии” при ИПЭЭ РАН. Авторы благодарны Д.В. Панкратову и Ю.А. Дарману за предоставленные фотографии водяного оленя и пробы волос.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках госзадания ИПЭЭ РАН ЕГИСУ НИОКТР № 121122200210-0 (Чернова О.Ф.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Все этические стандарты и нормы авторами соблюдены. Работы с живыми организмами не производились.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kim B.-J., Oh D.-H., Chun Seung-Hoon, Lee S.-D. Distribution, density, and habitat use of the Korean water deer (*Hydropotes inermis argyropus*) in Korea // Landscape and Ecological Engineering. 2010. V. 7. №7. P. 291–297.
- Фоменко П.В., Любченко Е.Н., Короткова И.П., и др. Экстерьер водяного оленя (*Hydropotes inermis* (Swinhoe, 1870), Cetartiodactyla, Cervidae), обнаруженного в южной части Приморского края // Зоологический журнал. 2022. Т. 101. № 9. С. 1072–1080.
- Harris R.B., Duckworth J.W. *Hydropotes inermis* // The IUCN Red List of Threatened Species. 2015:e.T10329A22163569.
- Jung J., Shimizu Y., Omasa K., Kim S., Lee S. Developing and testing a habitat suitability index model for Korean water deer (*Hydropotes inermis argyropus*) and its potential for landscape management decisions in Korea // Animal cells and systems. 2016. V. 20. №4. P. 218–227.
- Постановление регионального Правительства Приморского края от 22.08.2022, № 576-пп “О занесении в Красную книгу Приморского края редкого вида животного”.
- Дарман Ю.А. *Hydropotes inermis* // Млекопитающие России. Портал Рабочей группы по созданию атласа распространения млекопитающих России Териологического общества при РАН. 2019.
- Дарман Ю.А., Седаш Г.А. Корейский водяной олень (*Hydropotes inermis argyropus* Neude, 1884): очерк для включения нового вида в Красную книгу Российской Федерации // Биота и среда заповедных территорий. 2020. № 3. С. 35–40.
- Дарман Ю.А., Сторожук В.Б. Седаш Г.А. *Hydropotes inermis* (Cervidae) – новый вид для фауны России из национального парка “Земля леопарда” (Россия) // Nature Conservation Research. Заповедная наука. 2019. Т. 4. № 3. С. 127–129.
- Шотин А.Р., Иголкин А.С., Али М., и др. Африканская чума свиней в Приморском крае: эпизоотическая ситуация и молекулярно-биологические свойства изолята, выделенного из трубчатой кости от дикого кабана // Ветеринария сегодня. 2022. Т. 11. № 4. С. 347–358.
- Pocock R.I. On the external characters of *Elaphurus*, *Hydropotes*, *Pudu* and other Cervidae // Proceedings of Zoological Society. London. 1923. V. P. 181–207.
- Lee S.-J.; Kim, K.-Y.; Kim G., et al. Potential tick defense associated with skin and hair characteristics in Korean Water Deer (*Hydropotes inermis argyropus*) // Animals. 2024. V. 14. № 185. P. 1–8.
- Leslie D.V. Jr., Lee D.N., Dolman R.W. *Elaphodus cephalopus* (Artiodactyla: Cervidae) // Mammalian species. 2024. V. 45. № 904. P. 80–91.
- Соколов В.Е. Кожный покров млекопитающих. М.: Наука, 1973. 487 с.
- Соколов В.Е., Чернова О.Ф., Сейл Дж. Кожный покров тропических копытных. М.: Наука, 1984. 167 с.
- Чернова О.Ф., Целикова Т.Н. Атлас волос млекопитающих (тонкая структура остевых волос и игл в сканирующем электронном микроскопе). М.: Товарищество научных изданий КМК. 2004. 429 с.
- Рожнов В.В., Чернова О.Ф., Перфилова И.В. Видовая диагностика оленей – пищевых объектов амурского тигра (по микроструктуре остевых волос из экскрементов хищника). М.: Товарищество научных изданий КМК. 2011. 47 с.
- Meyer W., Pohlmeier K., Schnapper A., Hulmann G. Subgroup differentiation in the Cervidae by hair cuticle analysis // Zeitschrift für Jagdwissenschaft. 2001. Bd. 47. S. 253–258.
- Heckeberg N.S. The systematics of the Cervidae: a total evidence approach // PeerJournal. 2020. V. 8. e8114.
- Соколов В.Е., Данилкин А.А. Сибирская косуля (экологические аспекты поведения). М.: Наука, 1981. 149 с.
- Павлинов И.Я. Систематика современных млекопитающих. М.: Изд-во Московского Университета. 2003. 293 с.

**HAIR COAT OF THE WATER DEER
HYDROPOTES INERMIS (CERVIDAE, ARTIODACTYLA) –
A NEW SPECIES IN THE FAUNA OF RUSSIA**

O. F. Chernova^{a, #}, E. M. Shchelkanov^b

Presented by Academician of the RAS V.V. Rozhnov

^a*Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Moscow, Russian Federation*

^b*State University of Education, Moscow region, Mytishchi, Russian Federation*

[#]*e-mail: olga.chernova.moscow@gmail.com*

For the first time, the hair cover and hair microstructure of an adult male *Hydropotes inermis* from the Primorsky region of Russia were studied using light and scanning electron microscopy. The absence of abundant underfur, sparse wool and its weak layering are characteristic of this inhabitant of the temperate monsoon and tropical zones, which does not need an effective thermal protection. The alveolar and lattice medulla of the hair is similar to that of other deer, is well developed, and increases the heat-protective properties of the hair, since seasonal and daily fluctuations in temperature and humidity can be significant. The cuticle pattern is similar to that of deer tribes Alceini and Capreolini. The hair serves as reliable protection for the water deer from mechanical damage when moving through thickets of bushes and grasses along the banks of rivers and swamps in the biotopes that this deer inhabits, which is facilitated by the significant thickness and length of the hairs on the back, sides and thighs. The knotty nature of the hairs protects the deer's skin from the sharp growths of aquatic and marsh plants.

Keywords: Water deer, hair, microstructure, scanning electron microscopy, comparative morphology, adaptations, Primorsky krai

УДК 595.132

ПЕРВАЯ НАХОДКА ПОДОЦИТОВ В КРОВЕНОСНОЙ СИСТЕМЕ ЗАГАДОЧНЫХ ЧЕРВЕЙ – ЭХИУРИД (ANNELIDA: THALASSEMATIDAE)

© 2024 г. П. А. Кузнецов^{1, 2}, А. В. Ересковский^{1, 2, 3}, Е. Н. Темерева^{1, *}

Представлено академиком РАН В. В. Малаховым

Поступило 15.03.2024 г.

После доработки 25.03.2024 г.

Принято к публикации 30.03.2024 г.

Тонкое строение кровеносных сосудов хобота эхиурид известно в деталях, однако кровеносная система в туловище остается исследованной лишь на уровне общей анатомии. В результате изучения кровеносной системы туловища самок *Bonellia viridis* впервые для эхиурид были обнаружены специализированные клетки – подоциты. Они образуют стенку кольцевого и передней части вентрального кровеносных сосудов. Для подоцитов *B. viridis* характерна типичная клеточная архитектура, описанная для таких клеток у других Bilateria: они состоят из клеточного тела, первичных отростков и отходящих от них цитоподий, которые соединены друг с другом специализированными щелевыми диафрагмами. Наличие подоцитов в составе стенки брюшного и кольцевого сосудов свидетельствует о том, что именно эти участки кровеносной системы эхиурид выполняют функцию сайтов ультрафильтрации, где плазма крови фильтруется через базальную пластинку в полость туловищного целома.

Ключевые слова: подоцит, морфология, кровеносная система, ультрафильтрация, метанефридии, анальные мешки

DOI: 10.31857/S2686738924040055

Эхиуриды – это небольшая группа несегментированных морских бентосных червей [1, 2]. Систематическое положение этой группы неоднократно менялось, однако сейчас эхиурид безошибочно относят к кольчатым червям (Annelida) [3]. В отличие от большинства других представителей типа, эхиуриды утратили метамерное строение и полностью лишились дисеппиментов [1]. Их туловище, таким образом, содержит единый целомический мешок, не подразделенный на компартменты [1]. Утрата метамерии повлекла за собой и преобразования других систем органов. Так, у эхиурид отсутствуют метамерные метанефридии, а выделительные органы представлены необычными анальными мешками, которые несут многочисленные ресничные воронки и открываются в клоака.

Известно, что большинство эхиурид имеют замкнутую кровеносную систему, которая была изучена на общем анатомическом уровне [4]

и с использованием 3D реконструкции по сериям срезов [2]. В кровеносной системе эхиурид так же, как и у остальных кольчатых червей можно выделить восходящий дорсальный сосуд и нисходящий вентральный сосуд [5]. Однако у эхиурид дорсальный кровеносный сосуд присутствует только в передней части туловища и отсутствует в средней и задней частях туловища, где его заменяет синус вокруг пищеварительной трубки [1]. В хоботе есть три кровеносных сосуда: один аксиальный, который является продолжением дорсального сосуда, и два латеральных сосуда, которые сливаются вместе в туловище, образуя вентральный кровеносный сосуд. Строение кровеносных сосудов, проходящих в хоботе, хорошо известно [6, 7], однако тонкое строение кровеносной системы в туловище остается почти не изученным. Новые данные о локализации подоцитов в кровеносной системе и деталях их строения прольют свет на особенности функционирования метанефридиальной системы эхиурид в целом и расширят наши представления о физиологии этих необычных аннелид.

Цель настоящей работы – изучить тонкое строение подоцитов в кровеносной системе самок *B. viridis*.

Материалом для работы послужили взрослые самки *B. viridis* Rolando, 1822, которые были собраны у берегов Марселя на побережье Прованса,

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

²Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine et Continentale (IMBE), Aix Marseille University, CNRS, IRD, Avignon University, Marseille, 13007 France

³Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, Россия.

*e-mail: temereva@mail.ru

Франция, 43°16'38" СШ, 5°18'24" ВД. Морфология особей была изучена с помощью стереомикроскопа Leica M165C, оснащенного цифровой камерой Leica DFC420 (Leica Microsystems GmbH). После анатомирования отдельные части кровеносной системы были зафиксированы в 2,5% глutarовом альдегиде на 0,05 М какодилатном буфере, содержащем NaCl, в течение 8 ч при +4°C. Затем образцы промывали в какодилатном буфере (трижды в течение 4 ч) и повторно фиксировали в 1%-ном тетроксиде осмия в том же буфере. Образцы обезжизняли в возрастающих концентрациях этанола и заливали в смолу Embed-812 (Electron Microscopy Science). Полутонкие и тонкие срезы изготовили с помощью ультрамикротомы Leica UC7 (Leica Microsystems GmbH). Ультратонкие срезы контрастировали растворами уранил ацетата (0.5%) и цитрата свинца (0.4%), а затем исследовали с помощью электронного микроскопа JEOL JEM-1011 (JEOL Ltd.).

В составе кровеносной системы туловища эхиурид можно выделить нисходящую часть, которая представлена брюшным кровеносным сосудом, восходящую часть, которую составляют окологлазничные синус и дорсальный кровеносный сосуд, и поперечные кровеносные сосуды, соединяющие обе части.

В передней трети туловища от вентрального кровеносного сосуда отходит нейро-интестинальный сосуд, который заканчивается в кольцевом сосуда (рис. 1а). Стенки вентрального кровеносного сосуда в его передней трети и кольцевого сосуда образованы подоцитами. Эти клетки имеют как общие черты строения, так и незначительные различия в зависимости от их локализации. На уровне клеточной архитектуры у каждого подоцита можно выделить расширенное клеточное тело, первичные отростки и цитоподии (рис. 1б). В клеточном теле находится крупное ядро с выраженным ядрышком, комплекс Гольджи, многочисленные фагосомы и мультивезикулярные тельца (рис. 1б). Тело клетки и первичные отростки несут многочисленные апикальные выросты, направленные в полость тела. Первичные отростки имеют диаметр от 3 до 0.5 мкм и распластаны на поверхности базальной пластинки. В цитоплазме первичных отростков проходят тонкие пучки миофиламентов (рис. 1б-с). Первичные отростки дают начало многочисленным тонким цитоподиями, которые в свою очередь ветвятся и лежат между цитоподиями соседних подоцитов, вместе образуя характерный лабиринтоподобный рисунок (рис. 1б-с). Цитоподии в среднем достигают ширины от 0.1 до 0.25 мкм (рис. 1д). Между цитоподиями соседних подоцитов обнаруживаются контакты, которые могут быть описаны как щелевые диафрагмы: тонкая пластинка электронно-плотного вещества. Расстояние между цитоподиями и соответственно ширина щелевой диафрагмы не превышает 20 нм. Цитоподии лежат на плотной базальной пластинке, под которой находится толстый слой внеклеточного матрикса,

пронизанный коллагеновыми волокнами (рис. 1с-д). Несмотря на общие черты в строении подоцитов вентрального кровеносного сосуда и кольцевого сосуда, между ними есть и заметные различия. Цитоподии подоцитов кольцевого сосуда (рис. 1е) имеют гораздо больший диаметр и образуют менее сложный и менее разветвленный лабиринт, базальная пластинка выражена слабее, а апикальные выросты заметно длиннее и многочисленнее.

Считается, что подоциты находятся на определенных участках кровеносных сосудов, где формируются зоны ультрафильтрации [8]. Одна из главных особенностей подоцитов, которая позволяет отличить их от любых других клеток, — это наличие цитоподий, которые связаны друг с другом специализированными щелевыми диафрагмами. Через базальную пластинку кровеносных сосудов и щелевые диафрагмы между цитоподиями подоцитов происходит ультрафильтрация жидкости из полости сосудов в полость целома [9]. В результате ультрафильтрации в полости целома формируется первичная моча, которая за счет работы ресничных воронок метанефридиев попадает в выделительный канал, где подвергается вторичному всасыванию [10]. Подоциты, обнаруженные нами у *B. viridis* (рис. 1ф), цитологически соответствуют подоцитам, которые описаны у других Bilateria. Это позволяет предполагать, что зоны ультрафильтрации у *B. viridis* и, возможно, других эхиурид находятся в области передней части брюшного сосуда и кольцевого сосуда, т.е. в передней трети туловища, тогда как специализированные метанефридии — анальные мешки — расположены в задней части туловища [11].

Обнаруженные у подоцитов *B. viridis* многочисленные фагосомы и производные лизосом свидетельствуют о высокой эндоцитозной активности, которая характерна и для подоцитов других кольчатых червей [12]. Миофиламенты в основании первичных отростков (рис. 1ф) указывают на неполное разделение функций с миоэпителиальными клетками сосудов. Миофиламенты в базальных участках подоцитов описаны у многих кольчатых червей и других билатерий, например Phoronida [13, 14]. Одной из ярких особенностей подоцитов у *B. viridis* является наличие многочисленных апикальных выростов. Подобные выросты ранее были описаны для клеток целомического эпителия латеральных каналов и миоэпителия аксиального и латерального сосудов хобота самок *B. viridis* [7]. Таким образом, подоциты сохраняют ряд цитологических признаков, указывающих на их общее происхождение с миоэпителием сосудов и целомием.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа П.А. Кузнецова выполнена при финансовой поддержке гранта Вернадского от посольства Франции в Российской Федерации.

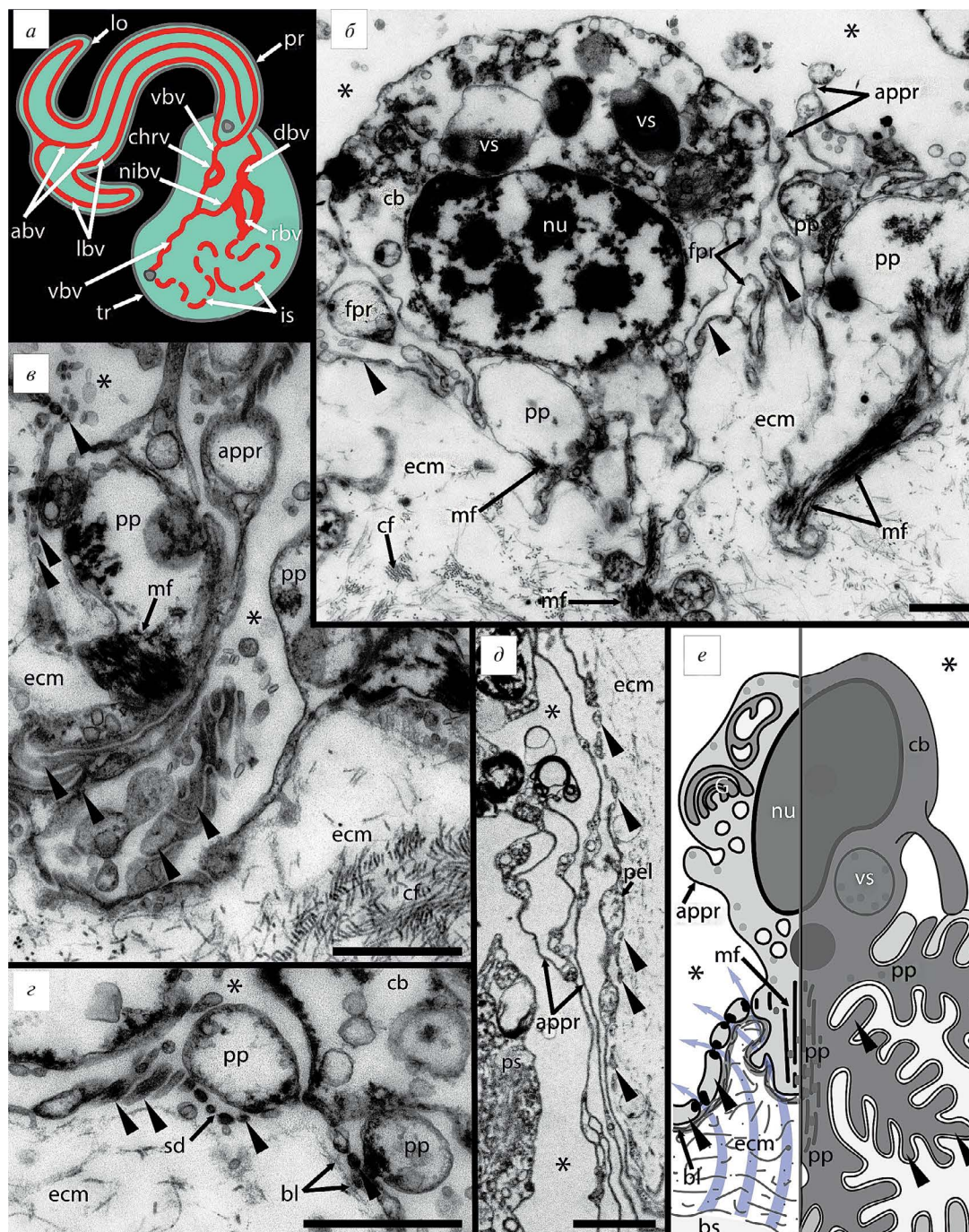


Рис. 1. Подоциты в кровеносной системе самок *Bonellia viridis*: (а) – схема организации кровеносной системы (б) – подоцит на поперечном срезе вентрального кровеносного сосуда, ТЕМ, (в) – первичные отростки и цитоподии подоцита вентрального кровеносного сосуда, ТЕМ, (г) – цитоподии подоцитов в вентральном кровеносном сосуда, ТЕМ, (д) – цитоподии подоцитов в кольцевом сосуда, ТЕМ, (е) – схема строения подоцита с цитоподиями: стрелками показано направление движения жидкости из кровеносной системы в полость туловищного целома. Обозначения: (abv) – аксиальный кровеносный сосуд, (appr) – апикальный вырост, (bl) – базальная пластинка, (bs) – полость сосуда, (cb) – клеточное тело, (cf) – коллагеновые филаменты, (chr) – кольцевой сосуд щетинок, (dbv) – дорсальный кровеносный сосуд, (ecm) – внеклеточный матрикс, (G) – комплекс Гольджи, (is) – околоткишечный синус, (lbv) – латеральный кровеносный сосуд, (lo) – лопасть хобота, (mf) – миофиламенты, (nu) – ядро, (nibv) – нервно-кишечный кровеносный сосуд, (pp) – первичный отросток подоцита, (pr) – хобот, (rbv) – кольцевой кровеносный сосуд, (tr) – туловище, (sd) – щелевая диафрагма, (vbv) – вентральный кровеносный сосуд, (vs) – везикулы. Звездочки (*) обозначают целомическую полость, наконечники стрелок указывают на цитоподии подоцитов. Масштаб – 1 мкм.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Работа проведена на беспозвоночных животных, представителей типа Annelida. В соответствии с пунктом 3 главы 1 директивы 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях, требования по биоэтике не распространяются на беспозвоночных животных, за исключением класса Cephalopoda (головоногие моллюски).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pilger J.F. Echiura. In *Microscopic anatomy of invertebrates*. New York: Wiley-Liss Inc. 1993. Vol. 12 P. 186–236.
2. Maiorova A.S., Adrianov A.V. Biodiversity of echiurans (Echiura) of the Kuril-Kamchatka Trench area // *Prog. Oceanogr.* 2020. Vol. 180. 102216.
3. Goto R., Monnington J., Sciberras M., et al. Phylogeny of Echiura updated, with a revised taxonomy to reflect their placement in Annelida as sister group to Capitellidae // *Invertebr. Syst.* 2020. Vol. 34. No. 1. 101.
4. Amor A. Modelos de sistema vascular en Echiura // *Asociación Argentina de Ciencias Naturales, Buenos Aires. Physis.* 1973. Vol. 32. Vol. 84. P. 115–120.
5. Schmidt-Rhaesa A. The evolution of organ systems. Oxford: Oxford University Press. 2007.
6. Bosch C. Les vaisseaux sanguins de la trompe chez *Bonellia viridis* (Echmrien) et leur musculature a fonction multiple // *Annales Des Sciences Naturelles: Zoologie Et Biologie Animale.* 1984. Vol. 6. P. 3–32.
7. Kuznetsov P., Temereva E. Ultrastructure of proboscis blood vessels in females of *Bonellia viridis* (Annelida: Bonellinae): New reconstructions // *J. Morphol.* 2022. Vol. 283. No. 6 P. 771–782.
8. Peters W. Possible site of ultrafiltration in *Tubifex tubifex* (Annelida, Oligochaeta) // *Cell. Tiss. Res.* 1977. Vol. 179. P. 367–375.
9. Bunke D. Ultrastructure of the metanephridial system in *Aeolosoma bengalense* (Annelida) // *Zoomorphol.* 1994. Vol. 114. P. 247–258.
10. Smith P.R. Polychaeta: Excretory system. In *Microscopic anatomy of invertebrates*. New York: Wiley-Liss Inc. 1992. Vol. 7. P. 71–108.
11. Lehrke J., Bartolomaeus T. Ultrastructure of the anal sacs in *Thalassema thalassum* (Annelida, Echiura) // *Zoomorphol.* 2011 Vol. 130 P. 39–49.
12. Bunke D. Ultrastructure of the metanephridial system in *Aeolosoma bengalense* (Annelida) // *Zoomorphol.* 1994. Vol. 114. P. 247–258.
13. Storch V., Hermann K. Podocytes in the blood vessel linings of *Phoronis muelleri* (Phoronida, Tentaculata) // *Cell. Tiss. Res.* 1978. Vol. 190. P. 553–556.
14. Temereva E.N., Malakhov V.V. Ultrastructure of the blood system in phoronid *Phoronopsis harmeri* Pixell, 1912: 1. Capillaries // *Russian Journal of marine biology.* 2004. Vol. 30. No. 1. P. 28–36.

FIRST DISCOVERY OF THE PODOCYTES IN THE CIRCULATORY SYSTEM OF ENIGMATIC ECHIURIDS (ANNELIDA: THALASSEMATIDAE)

P. A. Kuznetsov^{a, b}, A. V. Ereskovsky^{a, b, c}, E. N. Temereva^{a, #}

Presented by Academician of the RAS V.V. Malakhov

^aLomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^bInstitut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine et Continentale (IMBE), Aix Marseille University, CNRS, IRD, Avignon University, Marseille, France

^cKoltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

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

Fine structure of echiurid blood vessels in the proboscis is known in details, but the circulatory system of the trunk remains studied mainly at the level of general anatomy. The investigation of the trunk circulatory system in *Bonellia viridis* females revealed the presence of specialized podocytes in the ring vessel and anterior part of the ventral vessel. This study allowed to describe podocytes in echiurid circulatory system for the first time. Podocytes of *B. viridis* are characterized by a typical cellular architecture, which is known for other bilaterians: they consist of a cell body, primary processes, and pedicels that are interconnected via specialized slit diaphragms. The presence of podocytes in the ventral and ring vessels indicates these parts of circulatory system as sites of ultrafiltration in echiurids, i.e., exactly in these places, the filtration of plasma occurs through the basal lamina to the body cavity.

Key words: podocyte, morphology, circulatory system, ultrafiltration, metanephridia, anal sac

УДК 575.13:597.541

ПОЛНЫЙ МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ГЕНОМ *CLUPEONELLA ABRAU* (MALIATSKY, 1930) (CLUPEIFORMES) – ЭНДЕМИЧНОГО ВИДА ПРЕСНОВОДНЫХ РЫБ ИЗ ОЗЕРА АБРАУ (РОССИЯ)

© 2024 г. Д. П. Карабанов^{1, *}, Д. Д. Перебоев², Б. Д. Ефейкин², Ю. В. Кодухова¹,
член-корреспондент РАН А. А. Котов²

Поступило 01.03.2024 г.

После доработки 15.03.2024 г.

Принято к публикации 19.03.2024 г.

Абраусская тюлька *Clupeonella abrau* (Maliatsky, 1930) – эндемичный вид рыб озера Абрау (Краснодарский край, Россия). Проаннотированный полный митохондриальный геном *C. abrau* длиной 16650 п.н. с консервативным для сельдевых рыб расположением генов демонстрирует сходство в 98.8% с митогеномом родственного вида – черноморско-каспийской тюльки (*C. cultriventris*). Также последовательность гена COX1 была изучена у музейного экземпляра, собранного в оз. Абрау в 1938 г. Изменчивость у абраусской тюльки по локусу COX1 в современный период составляет около 0.15%, различие между абраусской и черноморско-каспийской тюлькой составляет 1.2%, а различия между музейным и современным образцами тюльки из оз. Абрау составляет 0.92%. Установлено, что в настоящее время абраусская тюлька не исчезла из рыбного сообщества и способна размножаться в текущих условиях. Предложены разные сценарии истории заселения тюлькой озера Абрау.

Ключевые слова: геномика, митохондриальный геном, рыбы, *Clupeonella abrau*, зоогеография, Понто-Каспийский регион

DOI: 10.31857/S2686738924040066

Среди различных водоемов России Кавказ исторически характеризовался исследователями как регион с большим числом редких и эндемичных форм [1]. Примером последнего служит абраусская тюлька (сарделька) *Clupeonella abrau* (Maliatsky, 1930) (Clupeiformes: Clupeidae) – эндемик оз. Абрау (44°41' с.ш., 38°19' в.д.), включенный в “Красную книгу Российской Федерации” как редкий уязвимый вид [2] и в “Красную книгу Международного союза охраны природы” как вид, находящийся под критической угрозой исчезновения [3].

Озеро Абрау, особо охраняемая природная территория, представляет из себя небольшой пресноводный водоем на территории Краснодарского края РФ, изолированный от Черного моря перешейком шириной 1.7 км, среднегодовая высота водной глади над уровнем моря 70 м, площадь

зеркала озера порядка 1.6 км², наибольшая глубина 10.5 м. К началу XXI века ихтиофауна оз. Абрау подверглась значительной трансформации, число видов увеличилось более чем в два раза за счет интродукции новых видов, хотя даже тогда абраусская тюлька была массовым видом в рыбном сообществе [4]. После вселения в озеро судака *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758) (Actinopterygii: Percidae) численность абраусской тюльки катастрофически сократилась [3] и на протяжении длительного периода стоял вопрос – а сохранился ли вообще [2] этот вид в ихтиофауне озера? Вместе с тем имеется и вероятность того, что в результате неоднократных интродукций реликтовая абраусская тюлька была замещена родственным видом, черноморско-каспийской тюлькой *C. cultriventris* (Nordmann, 1840).

Ответить на подобные вопросы позволяют современные методы молекулярной генетики [5]. Однако отдельные гены часто не обладают достаточным уровнем нуклеотидной изменчивости для адекватных заключений. В последнее время для этих целей все чаще исследуются полные митохондриальные геномы [6].

¹Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина
Российской академии наук, пос. Борок, Россия

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

*e-mail: dk@ibiw.ru

Цель настоящей работы — провести секвенирование нуклеотидной последовательности полного митохондриального генома *C. abraui* из современной популяции озера Абрау; на основании оценки нуклеотидного разнообразия по локусу COX1 провести сравнение современных данных с доступным историческим материалом из коллекции Зоологического музея РАН; высказать предположение о генезисе и таксономическом статусе современной популяции пресноводной тюльки оз. Абрау.

В результате работ при сборе зоопланктона в ночной период 14.10.2019 г. в пелагиали оз. Абрау (44°41'56" с.ш., 38°19'37" в.д.) в планктонную сеть Апштейна (диаметр 250 мм, конус 450 мм, мельничный газ №60) в качестве прилова в пробах было обнаружено 9 небольших рыб, принадлежавших к семейству Clupeidae. Гидрохимические характеристики поверхностного слоя при лове были следующие: температура +20.3°C, pH 7.85, электропроводность 630 мкС, минерализация 315 мг/л, жесткость 6.3 мг-экв/л, окислительно-восстановительный потенциал 87 мВ, концентрация растворенного кислорода 2.66 г/л, вода соответствует карбонатно-кальциевому типу с низкой минерализацией. При дальнейшем исследовании с использованием первоописания абраусской тюльки [7], диагноза А.Н. Световидова [8] и материала по *Harengula abraui* Maliatsky, 1930 из коллекции Зоологического музея Зоологического института РАН (муз. №28345, оз. Абрау, сбор 19.01.1938 г.) была установлена принадлежность выловленных рыб к *C. abraui*. От музейного образца №61 из коллекции ЗМ ЗИН РАН муз. №28345 (рыбы 62–64) с разрешения хранителя был получен образец ткани правого брюшного плавника. Представленный ваучер был использован для проведения ДНК-баркодинга по локусу COX1 с использованием внутренних “коротких” праймеров в соответствии [9]. Для всех выловленных в 2019 г. абраусских тюлек кроме ДНК-баркодинга по локусу COX1 также получены последовательности локусов 16S (мтДНК) и 18S (ядНК) в соответствии с ранее опробованным протоколом [9]. Для установления нуклеотидной последовательности полного митохондриального генома абраусской тюльки было использовано высокопроизводительное секвенирование на базе платформы Illumina NovaSeq6000 (парные чтения по 150 п.н., всего 77 млн чтений), выполненное в компании Novogene (<https://www.novogene.com/>). Пробоподготовка и постобработка результатов высокопроизводительного секвенирования выполнена в последовательности, описанной ранее [10]. Сборка генома выполнена по алгоритму NOVOPlasty ver.4.3.3 [11], в двух вариантах (использование в качестве “затравки” последовательности фрагмента COX1 от музейного образца абраусской тюльки, альтернативно использовался митохондриальный

геном *Clupeonella cultriventris* NC_015109), давших абсолютно одинаковый результат. Аннотирование, сравнение с референсными митогеномами и все генетические вычисления выполнены в uGENE v.49.1 [12]. Полученные уникальные последовательности депонированы в международную базу данных NCBI GenBank под номерами PP318216–24 (COX1), PP326849–56 (16S) и PP326857–58 (18S). Полный митохондриальный геном абраусской тюльки после проверки данных представлен в NCBI GenBank, номер записи PP328542.

Сравнение нуклеотидной изменчивости гена COX1 музейного образца с современными рыбами показало различие между ними (все замены синонимичные) на 6–7 п.н. (длина локуса 654 п.н.), тогда как внутри выборки 2019 г. для того же локуса различия составляли 1 п.н. Таким образом, с высокой вероятностью можно констатировать что современные тюльки в оз. Абрау относятся к той же генетической группе, что и музейный образец. Вместе с тем на основании этих генетических данных таксономический статус абраусских тюлек неоднозначен и требует дополнительного изучения. К сожалению, скудность музейной коллекции и длительная формалиновая фиксация образцов не позволила использовать этот уникальный музейный материал для полногеномного исследования, поэтому в качестве ваучера была использована особь №K20 из сбора 2019 г. По морфологическим признакам этот экземпляр полностью соответствует диагнозу абраусской тюльки [8]. Диагностические признаки ваучера K20 и лимиты признаков остальных рыб были следующими: общая длина рыбы $L=44.8$ (38.5–45.0) мм; длина тела рыбы до конца чешуйного покрова $l=37.7$ (33.2–38.6) мм; брюхо сжато с боков; хвостовой стебель короткий. Брюшные килевые чешуи хорошо выражены и на всем протяжении от горла до анального плавника образуют киль, килевых чешуй $c.sq.=26$. Самка, возраст 1+. Относительно длины головы, пластические признаки: высота головы $hc/c=60$ (51–61)%; диаметр глаза $do/c=30$ (26–34)%; длина верхней челюсти $lmx=37$ (30–4). Относительно длины тела рыбы, пластические признаки: длина головы $c/l=26$ (26–30)%; расстояния — антедорсальное $aD/l=51$ (46–53)%, антевентральное $aV/l=58$ (54–59)% и вентроанальное $VA/l=17$ (12–19)%; высота анального $IA/l=19$ (14–20)%, спинного $ID/l=13$ (10–16)%, левых грудного $IP/l=19$ (17–23)% и брюшного $IV/l=13$ (9–14)% плавников; наибольшая высота тела $H/l=17$ (14–18)%; высота хвостового стебля $h/l=2$ (2–3)%. Меристические диагностические признаки: жестких и разветвленных лучей в анальном A III 16 (II–II 14–17), спинном D III 12 (III–IV 11–12) и в брюшных V I 6 (I 6) плавниках; жаберных тычинок $sp.br.$ 43–43 (41–45) слева и справа соответственно; общее число позвонков $Vert.$ 44 (40–44).

Полученный круговой митохондриальный геном *Clupeonella abraui* имеет длину 16650 п.н. и состоит из 13 белок-кодирующих генов (PCG), 22 транспортных РНК (tRNA), 2 рибосомальных РНК (rRNA) и некодирующей области контрольного региона (рис. 1 и табл. 1). Длина, структура и организация митогенома соответствует таковой для сельдевых рыб [13]. По нуклеотидному составу в митогеноме несколько преобладают пиримидиновые останки ($A\% = 26.3$, $G\% = 19.1$, $C\% = 27.9$, $T\% = 26.7$) и наблюдается отрицательный GC-перекос (-0.186). Для белок-кодирующих

генов соотношение нуклеотидов несколько иное: $A\% = 23.7$, $G\% = 18.5$, $C\% = 28.5$, $T\% = 29.3$ при более выраженном отрицательном GC-перекосе (-0.214).

Общая длина PCG составляет 11436 п.н., что составляет 68.6% всего митогенома. Всего 13 генов, кодирующих белок, содержат 3812 кодонов (включая стоп-кодона). Частоты встречаемости конкретных кодонов в PCG митогенома *C. abraui* и *C. cultriventris* из Черного моря представлены на рис. 2. В анализируемом митохондриальном геноме абраусской тюльки обнаружены все 22 гена tRNA, типичные для рыб, из них 14 генов кодированы

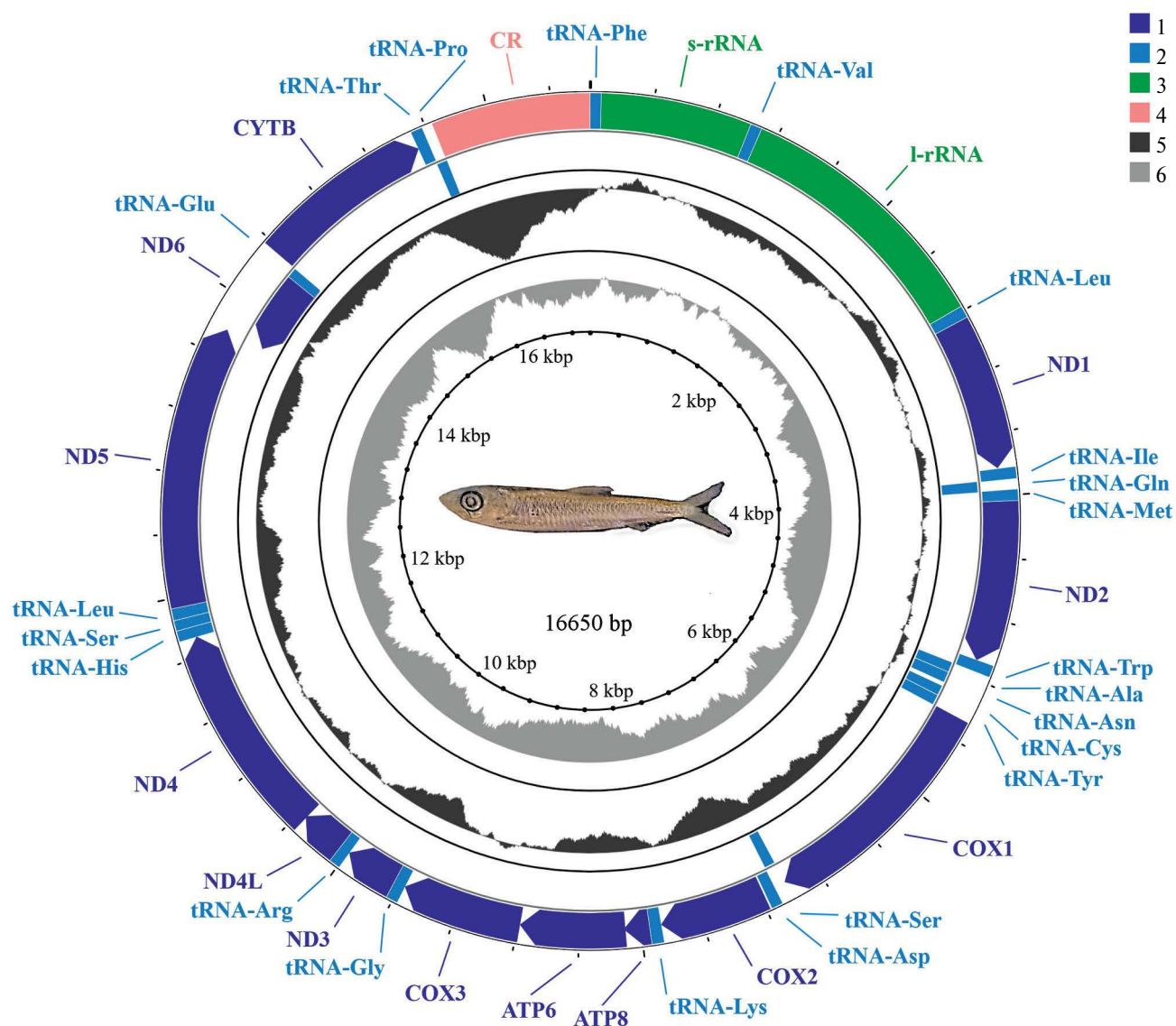


Рис. 1. Круговая карта митохондриального генома *Clupeonella abraui* (озеро Абрау). Внешний круг указывает на расположение и распределение генов в митогеноме. Гены, кодируемые Н (+) цепью и L (–) цепью, отображены во внешнем и внутреннем кольцах соответственно. Условные обозначения: 1 – белок-кодирующие гены; 2 – транспортная РНК; 3 – рибосомальная РНК; 4 – контрольный регион; 5 – содержание нуклеотидов G и C в молекуле ДНК (GC-content), средняя линия соответствует значению 0.5; 6 – неравномерность распределения нуклеотидов G+C в молекуле ДНК (GC-skew), средняя линия соответствует значению 0.

Таблица 1. Организация полноразмерного митохондриального генома *Clupeonella abraui* (озеро Абрау, Российская Федерация).

Ген	Цепь ДНК	Положение	Размер п.н. / а.а.	Межгенный промежуток (п.н.)	Антикодон (для tRNA) или старт/стоп-кодон (для PCG)	D (Cc/Ar)
tRNA-Phe	+	1–68	68	0	GAA	1/5
12s-rRNA	+	69–1019	951	0	–	1/78
tRNA-Val	+	1020–1091	72	0	TAC	0/2
16s-rRNA	+	1092–2771	1680	0	–	6/191
tRNA-Leu1	+	2772–2846	75	0	TAA	0/6
ND1	+	2847–3821	975/325	5	ATG/TAG	18/221
tRNA-Ile	+	3827–3898	72	–1	GAT	0/0
tRNA-Gln	–	3898–3968	71	–1	TTG	1/4
tRNA-Met	+	3968–4036	69	0	CAT	1/1
ND2	+	4037–5081	1045/348	–2	ATG/T--	21/243
tRNA-Trp	+	5082–5153	72	1	TCA	0/1
tRNA-Ala	–	5155–5223	69	1	TGC	0/1
tRNA-Asn	–	5225–5297	73	31	GTT	1/2
tRNA-Cys	–	5329–5394	66	2	GCA	0/4
tRNA-Tyr	–	5397–5467	71	1	GTA	0/2
COX1	+	5469–7019	1551/516	0	GTG/TAA	17/258
tRNA-Ser1	–	7020–7090	71	4	TGA	0/0
tRNA-Asp	+	7095–7164	70	12	GTC	0/5
COX2	+	7177–7867	691/230	0	ATG/T--	3/118
tRNA-Lys	+	7868–7941	74	1	TTT	0/2
ATP8	+	7943–8110	168/55	–10	ATG/TAA	1/16
ATP6	+	8101–8783	683/227	0	ATG/TA-	6/120
COX3	+	8784–9568	785/261	0	ATG/TA-	9/135
tRNA-Gly	+	9569–9640	72	0	TCC	0/1
ND3	+	9641–9989	349/116	0	ATG/T--	4/84
tRNA-Arg	+	9990–10058	69	0	TCG	0/3
ND4L	+	10059–10355	297/98	–7	ATG/TAA	2/54
ND4	+	10349–11729	1381/460	0	ATG/T--	32/302
tRNA-His	+	11730–11798	69	0	GTG	0/6
tRNA-Ser2	+	11799–11865	67	0	GCT	0/4
tRNA-Leu2	+	11866–11937	72	0	TAG	0/0
ND5	+	11938–13773	1836/611	–4	ATG/TAA	29/359
ND6	–	13770–14291	522/173	0	ATG/TAG	7/117
tRNA-Glu	–	14292–14360	69	4	TTC	0/1
Cytb	+	14365–15505	1141/380	0	ATG/T--	16/246
tRNA-Thr	+	15506–15577	72	–1	TGT	1/5
tRNA-Pro	–	15577–15646	70	0	TGG	0/1
D-Loop	+	15647–16649	1003	1	–	24/387

Примечание. Цепь ДНК соответствует (+) для Н и (–) для L. Значение D в п.н. показывает различия между генами абрауской тюльки относительно генетически наиболее близких видов, черноморско-каспийской тюльки (*Clupeonella cultriventris*) и сероспинки (*Alosa pseudoharengus*) соответственно.

на Н-цепи и 8 генов – на L-цепи ДНК (рис. 1 и табл. 1), общая длина всех транспортных РНК равна 1553 п.н. Все тРНК образуют типичные вторичные структуры “клеверного листа”, за исключением tRNA-Ser2 (GCT), у которых, как и у многих других рыб, редуцировано плечо DHU [14].

Ген малой (12S) митохондриальной субъединицы рРНК имеет длину 952 п.н., а большой (16S) субъединицы – 1680 п.н. Контрольный регион (CR, D-loop) у тюльки довольно компактный, длиной 1003 п.н. со специфичным нуклеотидным составом для регуляции репликации и транскрипции [14].



Рис. 2. Относительное использование синонимичных кодов (RSCU) в белок-кодирующих генах *C. abrau* (первые столбцы) и *C. cultriventrus* (вторые столбцы).

Организация митохондриального генома пресноводной тюльки из озера Абрау качественно не отличается от таковой из Черного моря. Различия между геномами тюлек составляют 202 п.н. (1.21%), при этом вариабельность по 24 позициям приходится на некодирующую последовательность контрольного региона, тогда как различия с ближайшим генетически схожим видом сероспинкой в разы превосходят эти значения (табл. 1). Считается, что для животных, как правило, межвидовые различия в генетических дистанциях должны на порядок превышать внутривидовую изменчивость [15].

Изменчивость у абрауской тюльки по локусу COX1 в современный период составляет около 0.15%, тогда как различие между абрауской и черноморско-каспийской тюлькой составляет 1.2%. С другой стороны, различия между музейным и современным образцами тюльки из оз. Абрау составляет 0.92%, что уже не столь сильно отличается от межвидового уровня, хотя и имеются уникальные нуклеотидные замены, которые однозначно различают последовательности тюлек из Абрау и Черного моря, в том числе в консервативных генах tRNA (табл. 1).

Происхождение абрауской тюльки (из современной популяции) от общего предка с черноморско-каспийской тюлькой, если провести пересчет скорости нуклеотидных замен для сельдевых на уровне около 1% за 3.6 млн.л. [16], приходится на поздний Плиоцен (2.6–3.9 млн.л. назад). Хотя к подобным пересчетам следует относиться с осторожностью, но эта датировка возникновения пресноводной формы, возможно, показывает на время деградации Понтического озера-моря. Вместе с тем

имеются данные [17], что как самостоятельный водоем оз. Абрау образовалось лишь в Голоцене в результате сейсмической деятельности. В этом случае реликтовая фауна могла заселить озеро из каких-то древних пресноводных рефугиумов. Для представителей р. *Clupeonella* и ранее [8] было известно несколько жилых пресноводных форм древнего происхождения и, вероятно, это в целом характерно для данных сельдевых рыб.

Вместе с тем нельзя вовсе исключать и вероятность вымирания исходной популяции и последующего генезиса современной популяции в оз. Абрау как результат вселения черноморско-каспийской тюльки из р. Кубань (откуда, по сообщениям местных жителей, на рубеже 2000-х годов завозился посадочный материал судака). Хорошо известно, что антропогенные инвазии сильно искажают генетическую структуру популяций, и при их наличии в совокупности исследуемых проб анализ времени дифференциации согласно подходу “молекулярных часов” приводит к неправдоподобным результатам [18]. Однако по нашим многолетним наблюдениям молодь и икра тюльки практически не выживают в искусственных условиях [19], поэтому интродукция этих рыб выглядит крайне маловероятной. Возможность самостоятельного вселения рыб из моря в озеро также сомнительна по причине отсутствия связи между водоемами.

Несмотря на колоссальную трансформацию экосистемы озера, можно отметить, что в настоящее время тюлька не исчезла из рыбного сообщества и способна размножаться в текущих условиях. Уменьшить конкуренцию (в первую очередь избежать гнета судака), по-видимому, позволяет очень

быстрое развитие икринки [8], стайный образ жизни и сложные вертикальные миграции [7], когда основную часть суток тюлька обитает в придонном слое воды, где она менее доступна для пелагических хищников.

Абраусская тюлька является своеобразным компонентом ихтиофауны памятника природы “Озеро Абрау”. Даже признание абраусской тюльки жилой пресноводной формой черноморско-каспийской тюльки не должно привести к отмене особого охранного статуса водоема, так как в целом более разумно вместо охраны отдельных таксонов заниматься охраной локальных фаун [20]. Примером такого подхода служит охрана популяции ряпушки (*Coregonus albula*) озера Плещеево (Россия), тогда как на остальной территории этот вид охраняемым не является [2], и рационально было бы распространить подобную практику и на другие территории.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность А.А. Махрову (ИПЭЭ РАН) за консультации и Р.З. Сабитовой (ИБВВ РАН) за неоценимую помощь в организации работ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Генетические работы выполнены за счет средств гранта Российского научного фонда № 23-14-00128, <https://rscf.ru/project/23-14-00128/>

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Работы выполнены в соответствии с “Программой научно-исследовательских работ ИБВВ РАН” на 2018-2022 гг. (утверждена 04.08.2017 г., приказ ФАР МСХ РФ №702 от 30.11.2018 г.)

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Динник К.Я. Общий очерк фауны Кавказа. Ставрополь: Типография Губернского Правления, 1910. 15 с.
2. Красная книга Российской Федерации. Животные. 2-ое издание. Москва: ФГБУ «ВНИИ Экология», 2021. 1128 с.
3. Freyhof J., Kottelat M. Abrau Sprat *Clupeonella abrau* / The IUCN Red List of Threatened Species. IUCN UK Office, Cambridge: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 2023. <https://dx.doi.org/10.2305/iucn.uk.2008.rlts.t4985A11106744.en>
4. Лужняк В.А. Ихтиофауна рек и лиманов Черноморского побережья России. // Вопросы ихтиологии. 2003. Т. 43. № 4. С. 457–463.
5. Rheindt F.E., Bouchard P., Pyle R.L., et al. Tightening the requirements for species diagnoses would help integrate DNA-based descriptions in taxonomic practice // PLoS Biology. 2023. V. 21. № 8. P. e3002251.
6. Hogg C.J., Ottewill K., Latch P., et al. Threatened species initiative: empowering conservation action using genomic resources // The Proceedings of the National Academy of Sciences. 2022. V. 119. № 4. P. e2115643118.
7. Малайский С. Новый, реликтовый вид сардельки из озера Абрау // Труды Азово-Черноморской научной рыбохозяйственной станции. 1930. Вып. 6. С. 65–74.
8. Световидов А.Н. Сельдевые (Clupeidae). Фауна СССР. Рыбы. Том 2. Выпуск 1. Москва, Ленинград: Издательство АН СССР, 1952. 333 с.
9. Karabanov D.P., Bekker E.I., Pavlov D.D., et al. New sets of primers for DNA identification of non-indigenous fish species in the Volga-Kama basin (European Russia) // Water. 2022. V. 14. P. e437.
10. Pereboev D.D., Karabanov D.P., Efeykin B.D., Kotov A.A. Annotated mitogenome of *Podonevadne trigona* (Sars, 1897) (Cladocera: Onychopoda: Podonidae) sheds light on the age of podonid differentiation // Arthropoda Selecta. 2024. V. 33. № 1. P. 14–94.
11. Dierckxsens N., Mardulyn P., Smits G. NOVOPlasty: de novo assembly of organelle genomes from whole genome data // Nucleic Acids Research. 2017. V. 45. № 4. P. e18.
12. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. 2012. V. 28. № 8. P. 1166–1167.
13. Lavoue S., Miya M., Saitoh K., et al. Phylogenetic relationships among anchovies, sardines, herrings and their relatives (Clupeiformes), inferred from whole mitogenome sequences // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2007. V. 43. № 3. P. 1096–1105.
14. Satoh T.P., Miya M., Mabuchi K., Nishida M. Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes // BMC Genomics. 2016. V. 17. P. e719.
15. Hebert P.D.N., Stoeckle M.Y., Zemplak T.S., Francis C.M. Identification of birds through DNA barcodes // PLoS Biology. 2004. V. 2. № 10. P. e312.
16. Canales-Aguirre C.B., Ritchie P.A., Hernandez S., et al. Phylogenetic relationships, origin and historical biogeography of the genus *Sprattus* (Clupeiformes: Clupeidae) // PeerJ. 2021. V. 9. P. e11737.
17. Островский А.Б. Происхождение озера Абрау и других бессточных котловин на Черноморском

- побережье Кавказа // Известия АН СССР. Серия географическая. 1970. № 1. С. 89–98.
18. Karabanov D.P., Kodukhova Y.V., Pashkov A.N., et al. “Journey to the West”: Three phylogenetic lineages contributed to the invasion of Stone Moroko, *Pseudorasbora parva* (Actinopterygii: Cyprinidae) // Russian Journal of Biological Invasions. 2021. V. 12. № 1. P. 67–78.
19. Карабанов Д.П. Генетические адаптации черноморско-каспийской тюльки *Clupeonella cultriventris* (Nordmann, 1840) (Actinopterygii: Clupeidae). Вопросы: Издательство “Научная книга”, 2013. 179 с.
20. Mina M.V. Problems of protection of fish faunas in the USSR // Netherlands Journal of Zoology. 1991. V. 42. № 2-3. P. 200–213.

**COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME
OF *CLUPEONELLA ABRAU* (MALIATSKY, 1930) (CLUPEIFORMES),
AN ENDEMIC SPECIES
OF FRESHWATER FISH FROM LAKE ABRAU (RUSSIA)**

**D. P. Karabanov^{a, #}, D. D. Pereboev^b, B. D. Efeykin^b, Y. V. Kodukhova^a,
Corresponding Member of the RAS A. A. Kotov^b**

^a*Papanin Institute for Biology of Inland Waters of Russian Academy of Sciences, Borok, Russian Federation.*

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

[#]*e-mail: dk@ibiw.ru*

The Abrau sprat (Tyulka or Sardelka) *Clupeonella abrau* (Maliatsky, 1930) is an endemic fish of Lake Abrau (Krasnodar Territory). The full mitogenome of *C. abrau* (16650 bp in length, with a conservative gene arrangement for Clupeidae) demonstrates 98.8% similarity with the mitogenome of a related species, the Black Sea-Caspian tulka (*C. cultriventris*) from the Black Sea. The sequence of the COX1 gene was also studied in a museum specimen collected in Lake Abrau in 1938. Variability in modern Abrau sprat COX1 locus is about 0.15%, the difference between *C. abrau* and *C. cultriventris* is 1.2%, and the difference between the Museum and modern samples of tulka from Lake Abrau is 0.92%. It has been confirmed that the Abrau sprat is present in the fish community and capable of reproducing in the lake. Various alternative scenarios for the settlement of Lake Abrau have been proposed.

Keywords: genomics, mitochondrial genome, fish, *Clupeonella abrau*, zoogeography, Ponto-Caspian Region

УДК 581.5:574

РАСТЕНИЯ РАЗНЫХ СЕМЕЙСТВ ОДНОДОЛЬНЫХ РАЗЛИЧАЮТСЯ ПО СОДЕРЖАНИЮ АЗОТА И ФОСФОРА В ЛИСТЬЯХ

© 2024 г. А. А. Бетехтина¹*, Н. А. Реутова¹, Д. В. Веселкин²

Представлено академиком РАН В.Н. Большаковым

Поступило 25.03.2024 г

После доработки 30.03.2024 г.

Принято к публикации 30.03.2024 г.

Исследовали содержание N и P в листьях растений пяти семейств однодольных: Poaceae, Cyperaceae, Orchidaceae, Iridaceae, Amaryllidaceae. Установлено, что виды разных семейств однодольных имели разные композиции N и P в листьях. Содержание N было низким у Iridaceae, а высоким — у Amaryllidaceae. Содержание P было самым низким у Cyperaceae и Poaceae, а самым высоким — у Amaryllidaceae и Iridaceae. Минимальное соотношение N/P было у Iridaceae, максимальное — у Poaceae. Таким образом, получены свидетельства определенной специфики содержания азота и фосфора в растениях разных семейств однодольных.

Ключевые слова: однодольные, Poaceae, Cyperaceae, Orchidaceae, Iridaceae, Amaryllidaceae, типы почвенного питания, функциональное разнообразие, plant traits

DOI: 10.31857/S2686738924040075

Азот (N) и фосфор (P) — ключевые биогенные элементы, доступность которых контролирует структуру и продуктивность биологических сообществ [1, 2]. Изучение закономерностей азотного и фосфорного питания растений имеет большое теоретическое и практическое значение. В частности, прогресс в области производства продовольствия в значительной степени является следствием того, что современные сельскохозяйственные технологии позволяют устранить или снизить лимитирующее рост растений влияние недостатка N и P в почвах [3].

С увеличением содержания N в почве содержание N в растениях увеличивается в глобальном [4] и региональном [5] масштабах. Но разные виды растений обычно различаются по содержанию N и P [6], в том числе в одних и тех же сообществах [7, 8]. Это связывают, прежде всего, с дифференциацией растений на разные функциональные типы, у которых выражены различия в протекании основных жизненных процессов — росте, выживании и размножении. Основной физиологический показатель, имеющий

наиболее важное значение в формировании функционального типа растения — интенсивность фотосинтеза; он сильно коррелирует с содержанием рибулозобисфосфаткарбоксилазы, на долю которого приходится до 75% азота листьев [9]. Содержание N тесно коррелирует с содержанием P. В основе продукции растений лежит сопряжение процессов фотосинтеза и поглощения N и P подземными органами. Эффективность процессов поглощения N и P различается у растений с разными типами почвенного питания — со способностью корней поглощать элементы минерального питания автономно или с помощью симбиотических приспособлений. У бореальных однодольных автономные (корни и корневые волоски разного строения, морковидные корни [10, 11]; аэренхима) и симбиотические (арбускулярная микориза [12, 13]; микориза орхидных [14]; темные септированные эндифиты) приспособления по-разному проявляются у разных таксонов, что приводит, в частности, к своеобразию синдромов строения корней Cyperaceae, Iridaceae, Poaceae и Orchidaceae [13]. На основании этого можно предположить, что содержание N и P в листьях однодольных растений может различаться у растений разных семейств. Цель работы — проверить предположение о различии в содержании N и P в листьях видов пяти семейств однодольных.

Проанализировали листья 41 вида пяти семейств — Amaryllidaceae, Cyperaceae, Iridaceae,

¹Уральский федеральный университет
им. первого Президента России Б.Н. Ельцина,
Екатеринбург, Россия

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

*e-mail: A.A.Betektina@urfu.ru

Orchidaceae и Poaceae. Листья растений Cyperaceae, Orchidaceae и Poaceae отобрали в разных, преимущественно естественных местообитаниях в пределах Белоярского южно-таежного ботанико-географического округа Свердловской области. 8 видов Cyperaceae: *Carex acuta*, *C. digitata*, *C. montana*, *C. nigra*, *C. palescens*, *C. supina*, *C. vesicaria*, *Carex* sp. Четыре вида Orchidaceae: *Cypripedium guttatum*, *Dactylorhiza fuchsii*, *Goodyera repens*, *Platanthera bifolia*. 11 видов Poaceae отобрали в естественных местообитаниях: *Alopecurus pratensis*, *Brachypodium pinnatum*, *Calamagrostis arundinacea*, *C. epigeios*, *Deschampsia cespitosa*, *Elytrigia repens*, *Helictotrichon desertorum*, *Melica nutans*, *Phleum phleoides*, *Ph. pratense*, *Phragmites australis*. Листья еще двух видов Poaceae — *Avena sativa* и *Miscanthus sacchariflorus* — отобрали у растений, росших на окультуренных почвах в Ботаническом саду УрФУ. При этом *Avena sativa* выращивали как без дополнительного внесения удобрений в год сбора материала, так и при дополнительном внесении один раз за вегетацию комплексного NPK удобрения в дозе 96 кг N и 96 кг P на гектар. Листья растений семейств Amaryllidaceae и Iridaceae отобрали в Ботаническом саду УрФУ и в Ботаническом саду УрО РАН. 10 видов Amaryllidaceae: *Allium aflatunense*, *A. altaicum*, *A. angulosum*, *A. ciantorum*, *A. cyathophorum* var. *Farreri*, *A. obliquum*, *A. ramosum*, *A. rubens*, *A. victorialis*, *A. zebdanse*. 6 видов Iridaceae: *Iris aphylla*, *I. halophila*, *I. pseudacorus*, *I. ruthenica*, *I. setosa*, *I. sibirica*.

Исследовали завершившие рост листья среднего яруса с 10–15 особей каждого вида. Из всех образцов каждого вида формировали 2–3 пробы массой по 10 г листьев в свежем состоянии. Пробы сушили 48 ч при 70°C, затем тонко измельчали. Содержание N определяли в трехкратной повторности методом мокрого сжигания по Кьельдалю (с использованием Heating Digestor DK 20 Velp и Distillation Unit UDK 12 Velp) и титриметрическим окончанием. Содержание общего фосфора измеряли спектрофотометрически после мокрого сжигания по Кьельдалю.

Растения разных семейств в среднем значительно различались между собой по содержанию N и P и по соотношению N/P. Об этом свидетельствовал результат многомерного дисперсионного анализа (MANOVA), в который включили все три переменные: $\lambda_{Wilks} = 0.20$; $F = 6.37$; $df_{effect} = 12$; $df_{error} = 90.25$; $P < 0.0001$. Попарные сравнения с использованием критерия Бонферрони (таблица 1) показали следующее. Содержание N было низким у Iridaceae, а высоким — у Amaryllidaceae (рис. 1). Содержание P было самым низким у Cyperaceae и Poaceae, а самым высоким — у Amaryllidaceae и Iridaceae. Минимальное соотношение N/P было у Iridaceae, максимальное — у Poaceae.

В целом у тех растений, в листьях которых было больше N, было также больше P. В полном массиве измерений между концентрациями N и P была

значимая положительная корреляция ($r = 0.38$; $P = 0.0144$; $n = 41$). В результате среднее массовое соотношение N/P у четырех семейств варьировало в диапазоне 10–16 и только у Iridaceae это соотношение было около 5. Средние геометрические величины содержания N, P и N/P, установленные нами (20.4 мг/г; 2.0 мг/г и 10.4), и опубликованные [15] значения (19.4 мг/г; 1.3 мг/г и 15.3) были близкими.

Таким образом, виды разных семейств однодольных имели разные композиции N и P в листьях. В нашем массиве только у Orchidaceae не установлено экстремальных характеристик химического состава. У четырех семейств минимум одна характеристика была в статистически значимом экстремуме. На качественном уровне это заключение хорошо соотносится с феноменом специфичности корневых синдромов семейств однодольных [13]. Однако представленный результат не кажется тривиальным. Поскольку стехиометрия N и P связана с пластическим и энергетическим обменом организмов [6], априорно не было оснований предполагать заметную таксономическую детерминацию этих свойств.

Дифференциация растений по содержанию N в листьях — результат эволюции и адаптации к актуальным условиям. Высокое содержание N и P в листьях — это показатель доступности питательных веществ и одновременно — признак конкурентно-рудеральных свойств, что обычно сопровождается высокой интенсивностью фотосинтеза. Усиление этих свойств обеспечено строением поглощающих корней, которые реализуют высокую поглощающую способность. Растения бедных местообитаний отличаются высокой эффективностью использования N и P, а строение их корней обеспечивает поглощение питательных веществ при их низких концентрациях с низкой скоростью.

По всей видимости, интенсивно поглощают N и P корни видов Amaryllidaceae, в листьях которых этих элементов было много. Строение поглощающих корней видов данного таксона систематически не исследовалось, поэтому связывать особенности состава их листьев с особенностями строения корней можно исключительно гипотетически.

Таблица 1. Средние значения ($\pm$ SE) и соотношение N и P в листьях видов пяти семейств однодольных. В каждом столбце гомогенные по критерию Бонферрони значения отмечены одинаковыми буквенными индексами

Семейство	N, мг/г	P, мг/г	N/P
Amaryllidaceae	30.65 $\pm$ 2.38 ^c	3.23 $\pm$ 0.36 ^b	10.21 $\pm$ 0.89 ^{ab}
Cyperaceae	15.69 $\pm$ 1.23 ^{ab}	1.29 $\pm$ 0.17 ^a	13.64 $\pm$ 1.69 ^{ab}
Iridaceae	14.09 $\pm$ 0.99 ^a	3.33 $\pm$ 0.62 ^b	4.95 $\pm$ 0.97 ^a
Orchidaceae	21.05 $\pm$ 1.28 ^{ab}	2.14 $\pm$ 0.14 ^{ab}	9.98 $\pm$ 1.02 ^{ab}
Poaceae	22.15 $\pm$ 1.41 ^b	1.74 $\pm$ 0.22 ^a	15.70 $\pm$ 2.23 ^b

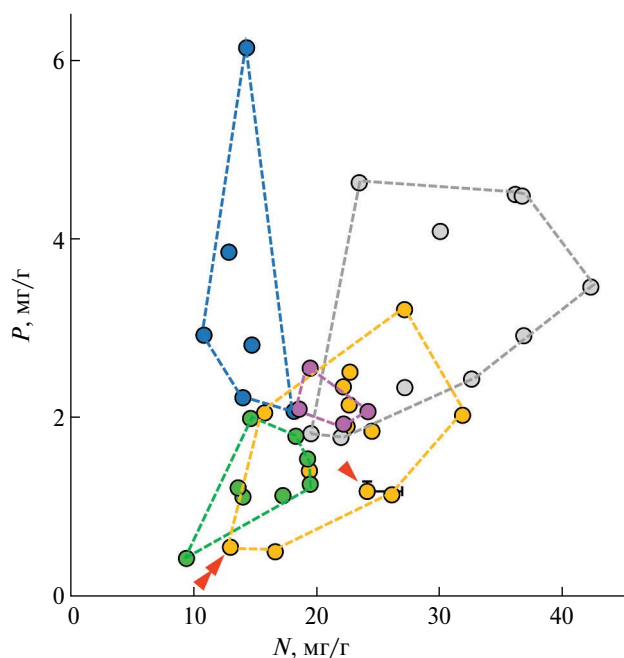


Рис. 1. Распределение видов семейств однодольных (* — Amaryllidaceae; • — Cyperaceae; • — Iridaceae; • — Orchidaceae; • — Poaceae) в пространстве, задаваемом содержанием N и P в листьях.

Одиночной красной стрелкой отмечена точка, характеризующая содержание N и P в листьях *Avena sativa* на окультуренной почве без дополнительного внесения удобрений. Диапазон содержания N и P в листьях этого вида при выращивании на дополнительно удобренной почве показан горизонтальными и вертикальными размахами. Двойной красной стрелкой отмечена точка, характеризующая содержание N и P в листьях *Miscanthus sacchariflorus*.

Высокое содержание P у Amaryllidaceae указывает на вероятность высокой интенсивности арбускулярной микоризы. Необходимо также исследовать, не связано ли активное поглощение N и P у Amaryllidaceae с частым формированием у видов этого семейства аэренхимы, присутствие которой обеспечивает доступ к дополнительным источникам N и P [16]. Вместе с тем наличие аэренхимы не может быть исчерпывающим объяснением высоких концентраций N и P в листьях, так как аэренхима нередка и у Cyperaceae и у Poaceae.

Низкое содержание P в листьях Cyperaceae может быть связано с условиями их произрастания, в которых, как правило, рост растений ограничен низким содержанием минеральных форм P, что объясняет слабое образование арбускулярной микоризы [10, 13]. Предположительно, осоки поглощают P из органических соединений с помощью автономных приспособлений — корневых волосков и моркововидных корней [10], которые, вероятно,

отличаются низкой интенсивностью поглощения. Приспособлением к поглощению P служат также тонкие корни осок, имеющие большую площадь контакта с почвой на единицу объема корня [17].

Одна из особенностей корней видов Iridaceae, у которых было мало N и много P, — их большая толщина [13], что связывают с адаптацией к дефициту азота [18]. Высокое содержание P у Iridaceae может объясняться обильной арбускулярной микоризой у них [13]. Но известно, что при интенсивном развитии арбускулярной микоризы из-за высокой потребности грибных симбионтов в азоте поступление N в растения может ограничиваться [19].

Неожиданно, что мы не нашли специфики содержания N и P у Orchidaceae, учитывая крайне специализированное строение их очень толстых неразветвленных корней с особым, свойственным только Orchidaceae, типом микоризы [13, 14]. Не исключено, что для надежного суждения об особенностях состава листьев Orchidaceae необходимо увеличение числа обследованных видов. Промежуточное положение Poaceae по содержанию N и P более ожидаемо, поскольку значения большинства признаков строения корней у Poaceae также были промежуточными между другими семействами [13]. Единственный признак, который у Poaceae в экстремуме, — короткие корневые волоски, в среднем, самые короткие из Cyperaceae, Iridaceae, Orchidaceae и Poaceae [13].

Наши материалы не позволяют быть абсолютно уверенными, что наблюдаемое содержание биогенов в растениях обусловлено исключительно принадлежностью вида к тому или иному семейству, а не к тем или иным условиям. Например, виды Cyperaceae и Orchidaceae преимущественно приурочены к почвам с высоким содержанием органики и дефицитом минеральных форм N, а травы с арбускулярной микоризой (Amaryllidaceae, Iridaceae, Poaceae) предпочитают почвы с большей доступностью неорганических соединений N [20]. Мы собирали листья Amaryllidaceae и Iridaceae в ботанических садах в крупном городе, хотя и не всегда на окультуренных почвах. Не обусловлено ли большее содержание P у видов этих семейств местом сбора? Этот вопрос требует специальной проверки. Но два вида злаков — *Avena sativa* и *Miscanthus sacchariflorus* также собраны в ботаническом саду, а *Avena sativa* при этом — на окультуренной почве и при дополнительном внесении N и P в год выращивания растений. Несмотря на это, у *Avena sativa* и *Miscanthus sacchariflorus* содержание N низкое или среднее, а содержание P — низкое. Следовательно, таксономический сигнал в массиве наших измерений реален, а амплитуда экологической изменчивости содержания N и P, хотя и оцененная фрагментарно, не велика и, вероятно, не имеет решающего значения.

Заключение. В этом исследовании мы впервые представили данные по содержанию N и P и по соотношению N/P у видов пяти семейств однодольных растений, различающихся по строению корней, т.е. в связи с разнообразием способов почвенного питания, свойственных разным таксонам. Невозможность исчерпывающего объяснения установленных закономерностей указывает на фрагментарность существующих знаний о биоэкологических особенностях однодольных в подземной сфере. Например, не ясны причины, обуславливающие сходство содержания N и P у орхидей и злаков, хотя строение корней и типы микоризы у них очень контрастно различаются. Необходимы также специальные исследования функциональных черт, обуславливающих высокое содержание N и P у Amaryllidaceae. Однако в целом можно уверенно считать, что у бореальных однодольных выражена заметная специфика содержания N и P, коррелирующая с принадлежностью к тому или иному семейству. Следовательно, есть основания утверждать, что специфичность морфологического строения корней семейств однодольных сопровождается сходного масштаба специфичностью содержания N и P.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-26-00248, <https://rscf.ru/project/24-26-00248/>

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Elser J.J. et al. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems // *Ecology letters*. 2007. Т. 10. № 12. С. 1135–1142.
2. Bui E.N., Henderson B.L. C: N: P stoichiometry in Australian soils with respect to vegetation and environmental factors // *Plant and soil*. 2013. Т. 373. С. 553–568.
3. Awasthi P., Laxmi A. Root Architectural Plasticity in Changing Nutrient Availability // *Rhizobiology: Molecular Physiology of Plant Roots*. 2021. С. 25–37.
4. He M. et al. Leaf nitrogen and phosphorus of temperate desert plants in response to climate and soil nutrient availability // *Scientific Reports*. 2014. Т. 4. № 1. С. 6932. 1.
5. Зубкова Е.В., Стаменов М.Н., Припутина И.В., Грабовский В.И. Использование методов фитоиндикации для оценки связи содержания азота в растениях с условиями их произрастания (на примере лесов Южного Подмосквы) // *Ботанический журнал*. 2023. Т. 108. №10. С. 896–913.
6. Güsewell S.N. P ratios in terrestrial plants: variation and functional significance // *New phytologist*. – 2004. Т. 164. № 2. С. 243–266. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01192.x>
7. Бетехтина А.А. и др. За 50 лет зарастания отвала золы содержание азота и фосфора изменилось в эмбриоземе, но не изменилось в растениях // *Экология*. 2023. № 4. С. 281–290.
8. Онипченко В.Г. и др. Химический состав листьев растений как функциональный признак формирования альпийских растительных сообществ // *Экология*. 2023. № 6. С. 407–415.
9. Chapin F.S. et al. Plant responses to multiple environmental factors // *Bioscience*. 1987. Т. 37. №1. С. 49–57.
10. Konoplenko M.A., Güsewell S., Veselkin D.V. Taxonomic and ecological patterns in root traits of Carex (Cyperaceae) // *Plant and Soil*. 2017. Т. 420. С. 37–48.
11. Lambers H. Phosphorus acquisition and utilization in plants // *Annual Review of Plant Biology*. 2022. Т. 73. С. 17–42.
12. van Der Heijden M.G.A. et al. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future // *New phytologist*. 2015. Т. 205. №4. С. 1406–1423.
13. Betekhtina A.A., Tukova D.E., Veselkin D.V. Root structure syndromes of four families of monocots in the Middle Urals // *Plant Diversity*. 2023.
14. Minasiewicz J. et al. Stoichiometry of carbon, nitrogen and phosphorus is closely linked to trophic modes in orchids // *BMC Plant Biology*. 2023. Т. 23. № 1. С. 422.
15. Wang Z. et al. Divergent nitrogen and phosphorus allocation strategies in terrestrial plant leaves and fine roots: A global meta-analysis // *Journal of Ecology*. 2022. Т. 110. № 11. С. 2745–2758.
16. Postma J.A., Lynch J.P. Root cortical aerenchyma enhances the growth of maize on soils with suboptimal availability of nitrogen, phosphorus, and potassium // *Plant physiology*. 2011. Т. 156. №3. С. 1190–1201.
17. Gahoonia T.S., Nielsen N.E. Barley genotypes with long root hairs sustain high grain yields in low-P field // *Plant and Soil*. 2004. Т. 262. С. 55–62.
18. Roumet C. et al. Root structure–function relationships in 74 species: evidence of a root economics spectrum related to carbon economy // *New Phytologist*. 2016. Т. 210. №3. С. 815–826.

19. Yang X. *et al.* How arbuscular mycorrhizal fungi drives herbaceous plants' C: N: P stoichiometry? A meta-analysis // *Science of The Total Environment*. 2023. T. 862. C. 160807.
20. Макаров М.И. Роль микоризы в трансформации соединений азота в почве и в азотном питании растений (обзор) // *Почвоведение*. 2019. №2. С. 220–233.

PLANTS OF VARIOUS MONOCOT FAMILIES DIFFER IN NITROGEN AND PHOSPHORUS CONTENT IN LEAVES

A. A. Betekhtina^{a, #}, N. A. Reutova^a, D. V. Veselkin^b

^a*Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation*

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

[#]*e-mail: A.A. Betekhtina@urfu.ru*

Presented by Academician of the RAS V.N. Bolshakov

The content of N and P in the leaves of the following five families of monocots was studied: Poaceae, Cyperaceae, Orchidaceae, Iridaceae, Amaryllidaceae. It was found that species of different families of monocots had different N and P content and ratio in their leaves. N content was low in Iridaceae and high in Amaryllidaceae. P content was the lowest in Cyperaceae and Poaceae and the highest in Amaryllidaceae and Iridaceae. The minimum N/P ratio was in Iridaceae, the maximum in Poaceae. Thus, the content of N and P and their ratio is specific in different families of monocots.

Keywords: monocotyledons, Poaceae, Cyperaceae, Orchidaceae, Iridaceae, Amaryllidaceae, types of soil nutrition, functional diversity, plant traits

УДК 578.825.1:615.281.8

КОМБИНИРОВАННЫЙ ЭФФЕКТ БАЗОВЫХ ПРОТИВОГЕРПЕТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ С НОВЫМ ИНГИБИТОРОМ ТЕРМИНАЗНОГО КОМПЛЕКСА ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА 1-ГО ТИПА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК VEROE6

© 2024 г. В. Л. Андропова^{1, *}, Г. А. Галегов¹, О. А. Воздвиженская²,
Г. Л. Левит², В. П. Краснов², академик РАН В. Н. Чарушин²

Поступило 01.03.2024 г.

После доработки 30.03.2024 г.

Принято к публикации 30.03.2024 г.

Более 90% населения Земли являются носителями вируса простого герпеса 1 типа (ВПГ-1). Инфекция проявляется образованием волдырей и язв на лице или половых органах и может вызывать слепоту, энцефалит, генерализацию инфекции. Все современные противовирусные препараты первого и второго рядов избирательно ингибируют вирусную ДНК-полимеразу. Описанный нами ранее конъюгат пурина и бензоксазина LAS-131 [(S)-4-[6-(пурин-6-ил)аминогексаноил]-7,8-дифторо-3,4-дигидро-3-метил-2H-[1,4]бензоксазин] использует в качестве биомиметики большую субъединицу терминазного комплекса ВПГ-1 и селективно ингибирует репродукцию *in vitro*. Нами впервые получены принципиально новые результаты по комбинированному воздействию на герпесвирусную инфекцию человека LAS-131 с практически значимыми противовирусными соединениями — аналогами нуклеозидов (ацикловир [АЦВ], пенцикловир [ПЦВ], ганцикловир [ГЦВ], бривудин [БВДУ], иоддезоксисуридин [ИДУ], аденинарабинозид [Ара-А]), а также аналогом нуклеозидфосфоната (цидофовир [CDV]) и аналогом приофосфата (фоскарнет [ФОС]). С помощью метода ингибирования цитопатического эффекта (ЦПЭ), индуцированного вирусом, показано, что при сочетании с LAS-131 концентрации соединений в комбинации, обеспечивающие ингибирование индуцированного ВПГ-1 ЦПЭ на 50%, снижались в 2 раза (аддитивный эффект, ФОС) и более (синергический эффект, АЦВ, ПЦВ, ГЦВ, ИДУ, БВДУ, Ара-А, ЦДВ). В условиях существенного снижения концентраций агентов создаются непермиссивные условия для репродукции ВПГ-1 и открываются новые реальные возможности контроля герпесвирусной инфекции человека.

Ключевые слова: вирус герпеса простого типа 1, конъюгат пурина и бензоксазина, противовирусные препараты, устойчивость к противовирусным препаратам, комбинированная терапия

DOI: 10.31857/S2686738924040071

Инфекция вируса простого герпеса (ВПГ) — одна из наиболее распространенных во всем мире [1]. Зарегистрированные в настоящее время противовирусные препараты первой и второй линий,

способные контролировать эту тяжелую инфекцию, блокируют репликацию вируса, выступая в качестве конкурентных субстратов для вирусной ДНК-полимеразы (ДНК-pol) и ингибируя ее активность [2]. Ограниченность перечня лекарств первой линии (модифицированных нуклеозидов и их предлекарств — ацикловира (АЦВ), валацикловира (валтрекс), фамцикловира (фамвир), развитие у вируса лекарственной резистентности, а также тяжелые побочные эффекты у препаратов второй линии (фоскарнет (ФОС, фоскавир) и цидофовир (ЦДВ) [3, 4] обуславливают необходимость продолжения разработки новых противовирусных препаратов, поражающих биомиметику, принципиально отличные от ДНК-pol, которые могли

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

*e-mail: andronova.vl@yandex.ru

бы расширить возможности контроля герпетических инфекций [5,6].

Стратегия комбинированной лекарственной противовирусной терапии состоит в воздействии на инфекционный процесс двумя и более препаратами с различными механизмами действия. При синергическом или аддитивном характере их взаимодействия становится возможным не только повысить эффективность проводимой терапии, использовать лекарства в более низких дозах, снижая вероятность развития нежелательных побочных эффектов лекарств, но и препятствовать развитию лекарственной резистентности. Поэтому комбинированная терапия — это “золотой стандарт” лечения ряда вирусных инфекций, включая ВИЧ-1 [7], вирус гепатита С [8] и вирус гриппа [9, 10]. Есть ограниченный клинический опыт сочетанного использования АЦВ и ФОС. Однако ввиду тяжелых побочных эффектов такая тактика может применяться только в особо тяжелых случаях, когда существует угроза жизни пациента [11].

Нами впервые была выявлена группа соединений, конъюгатов пурина и бензоксазина, проявивших селективную активность *in vitro* на модели ВПГ-1, включая штаммы, резистентные к действию АЦВ [12]. Выбрано соединение-лидер LAS-131 [(S)-4-[6-(пурин-6-ил)аминогексаноил]-7,8-дифторо-3,4-дигидро-3-метил-2H-[1,4]бензоксазин] и установлена значимая мутация в гене большой субъединицы терминазного комплекса (UL15), с которой связано развитие резистентности у вируса к LAS-131, и таким образом определена биомишень этого соединения [13] — терминаза ВПГ, фермент, абсолютно необходимый для репродукции вируса, осуществляющий нарезание и упаковку в капсид вирусной ДНК [14]. Насколько нам известно, LAS-131 является первым ингибитором моторной функции терминазного комплекса ВПГ-1. С 2017 г. в клиническую практику (в России с 2022 г.) введен препарат Превимис (Previmis, действующее вещество летермовир, MerckSharp&Dohme B.V.) — ингибитор, нацеленный на малую субъединицу терминазного комплекса цитомегаловируса (ЦМВ) и предназначенный для профилактики заболеваний, вызываемых ЦМВ после недавно перенесенной пересадки костного мозга у взрослых. Однако летермовир имеет очень узкий спектр действия и не влияет на репродукцию других герпесвирусов [15]. Что касается доступных для практической медицины препаратов, активных против ВПГ-инфекций, поражающих биомишень, отличную от ДНК-pol, то этот перечень пока ограничен препаратом Amenalief® (Maruho) на базе ингибитора хеликазо-праймазного комплекса ВПГ и вируса варицелла зостер (ВЗВ) аменамевира, разрешенного в 2017 г. лишь в Японии для лечения опоясывающего лишая (инфекция ВЗВ), а с 2023 г. и для лечения рецидивирующего ВПГ [16, 17].

Целью настоящего исследования была оценка *in vitro* сочетанного эффекта соединений, использующих различные биомишени — LAS-131 (ингибитора терминазного комплекса) с известными противогерпетическими агентами, включая практически значимые (ингибиторы ДНК-pol).

Препараты. Соединение LAS-131, [(S)-4-[6-(пурин-6-ил)аминогексаноил]-7,8-дифторо-3,4-дигидро-3-метил-2H-[1,4]бензоксазин] $C_{20}H_{22}F_2N_6O_2$, Mw 416.42) синтезировано в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрОРАН, как описано нами ранее [12].

Использовали следующие противовирусные агенты производства Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США): ацикловир (АЦВ, 9-[(2-гидроксиэтокси)метил]гуанин, $C_8H_{11}N_5O_3$; Mw 225.20 г/моль), пенцикловир (ПЦВ, 9-[4-гидрокси-3-(гидроксиметил)бутил]гуанин, $C_{10}H_{15}N_5O_3$, Mw 253.26), ганцикловир (ГЦВ, 9-[(1,3-дигидрокси-2-пропокси)метил]гуанин, $C_9H_{13}N_5O_4$; Mw 255.23), (Е)-5-(2-бромвинил)-2'-дезоксисуридин (БВДУ, бривудин, $C_{11}H_{13}BrN_2O_5$, Mw 333.14); 5-йод-2'-дезоксисуридин (ИДУ, $C_9H_{11}IN_2O_5$; Mw 354.10), 9-β-D-арабинофуранозиладенин (Ара-А, $C_{10}H_{13}N_5O_4$, Mw 267.24), цидофовир (ЦДВ, $C_8H_{14}N_3O_6P$, Mw 279.19) и фоскарнет (ФОС, $CH_3O_5P \times 6H_2O$, Mw 300.04).

ВПГ-1, штамм L₂ (ВПГ-1/L₂) получен из Государственной коллекции вирусов ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России. Культура клеток Vero E6 любезно предоставлена профессором А.М. Бутенко (ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России). Использовали комбинации соединений в нецитотоксичных концентрациях, контроль токсического эффекта отдельных соединений и их комбинаций осуществляли с помощью метода окрашивания клеток трипановым синим, позволяющим оценить количество живых и мертвых клеток в экспериментальной системе. Противовирусную активность соединений и их комбинаций оценивали методом ингибирования развития вирусиндуцированного цитопатического эффекта, а характер взаимодействия комбинируемых соединений — путем вычисления индекса FIC (fractional inhibitory concentration) по формуле:

$$FIC = \frac{ИД_{50} \text{ соединения А в комбинации}}{ИД_{50} \text{ соединения А}} + \frac{ИД_{50} \text{ соединения В в комбинации}}{ИД_{50} \text{ соединения В}},$$

как подробно описано нами ранее [18]. Необходимые для расчета величины ИД₅₀ индивидуальных веществ приведены в таблицах 1 и 2.

Как следует из данных, приведенных в табл. 1 и 2, сочетанное использование LAS-131 с ФОС (пирофосфатный аналог, нарушающий функционирование вирусной ДНК-pol, ингибируя отщепление пирофосфата от нуклеозидтрифосфата [2, 19]) обеспечивает аддитивный эффект взаимодействия

Таблица 1. Противогерпетическая активность ряда соединений на модели ВПГ-1 в культуре клеток Vero E6

Соединение	ЦД ₅₀ , мкг/мл	ИД ₅₀ , мкг/мл	ИД ₉₅ , мкг/мл	ИС
LAS-131	122.22 ± 6.48	1.95	7.8	62.68
АЦВ	>250	0.39	1.56	>1026
ГЦВ	>100	0.56	11.25	>179
ПЦВ	>100	1.95	7.8	> 51
БВДУ	>250	0.096	0.19	>4167
ИДУ	>250	3.9	31.25	>64
ФОС	>62.5	31.2	62.5	>2
Ара-А	80.0 ± 4.12	15.6	62.5	5.12
ЦДВ	>62.5	3.9	15.6	>52

Примечание. Множественность инфицирования 0.1 БОЕ/кл, продолжительность инкубации 48 ч. ЦД₅₀ – концентрация соединения, в присутствии которой выживает 50% клеток (метод окрашивания клеток трипановым синим). Величину ЦД₅₀ определяли методом интерполяции по графику зависимости количества мертвых клеток (%) от концентрации соединения. “>” – эффект не достигается. ИД₅₀ и ИД₉₅ – концентрации соединений, в присутствии которых ингибируется развитие вирусиндуцированного цитопатического эффекта (ЦПЭ) при 95–100% ЦПЭ в контроле вируса. Величину индекса селективности (ИС) вычисляли как отношение ЦД₅₀ к ИД₅₀. Приведены результаты двух независимых опытов.

Таблица 2. Эффективность LAS-131 в комбинации с известными противогерпетическими агентами на модели ВПГ-1 в культуре клеток Vero E6

Соединение	ЦД ₅₀ , мкг/мл	ИД ₅₀ , мкг/мл	ИД ₉₅ , мкг/мл	FIC	Эффект
LAS-131 + АЦВ	>15.6 + 0.05	0.39 + 0.15	3.9 + 0.05	0.59	Синергический
LAS-131 + ГЦВ	>6.25 + 0.35	0.78 + 0.18	0.78 + 0.35	0.72	Синергический
LAS-131 + ПЦВ	>3.9 + 3.9	0.49 + 0.49	0.24 + 0.98	0.50	Синергический
LAS-131 + БВДУ	>15.6 + 0.018	0.49 + 0.023	1.95 + 0.094	0.50	Синергический
LAS-131 + ИДУ	>3.9 + 1.95	0.49 + 0.49	0.98 + 1.95	0.38	Выраженный синергический
LAS-131 + ФОС	>62.5 + 7.8	7.8 + 0.98	1.56 + 12.5	1.0	Аддитивный
LAS-131 + Ара-А	>3.9 + 62.5	0.49 + 3.9	0.49 + 15.6	0.5	Синергический
LAS-131 + ЦДВ	>15.6 + 31.25	0.25 + 1.95	0.25 + 7.8	0.63	Синергический

Примечание. Множественность инфицирования 0.1 БОЕ/кл, продолжительность инкубации 48 ч. См. примечание к таблице 1. Индекс FIC (fractional inhibitory concentration) – индекс фракционной ингибирующей концентрации. Приведены результаты двух независимых опытов.

(FIC=1), иными словами минимальная активная концентрация (ИД₅₀) каждого из соединений, установленная при их раздельном использовании, в комбинации может быть снижена в два раза.

При более низких значениях FIC (FIC<1), являющегося критерием эффективности сочетанного действия препаратов, эффект комбинации соединений может быть отнесен к синергическому или взаимоусиливающему. При использовании LAS-131 в комбинации с любым из включенных в исследование модифицированным нуклеозидом наблюдали взаимоусиливающий эффект с FIC в диапазоне от 0.72 и ниже. Таким образом, при сочетанном использовании LAS-131 с противовирусными агентами этой группы комбинируемые соединения можно использовать в меньших концентрациях и при этом получить более выраженный противовирусный эффект, чем при индивидуальном использовании.

Выраженное синергическое взаимодействие соединений определяется как минимум 4-кратным снижением ИД₅₀ каждого соединения в паре, таким образом, величина FIC в этом случае будет равна или ниже 0,5 (FIC < 0.5). Наиболее выраженный взаимоусиливающий эффект наблюдался при использовании LAS-131 в комбинации с ИДУ (FIC = 0.38).

Изучение взаимодействия между лекарствами важно потому, что в ряде случаев комбинированное использование препаратов может привести к нежелательным последствиям [20].

На основании полученных нами результатов можно заключить, что комбинация LAS-131 с модифицированными нуклеозидами может служить полезным подходом для лечения герпетических инфекций и может быть более эффективным терапевтическим вариантом, чем монотерапия. Полученные результаты согласуются с нашим заключением,

что LAS-131 имеет механизм действия и биомишень, отличные от модифицированных нуклеозидов [13]. Как известно, в функции pUL15 в составе терминального комплекса входит упаковка синтезируемой ДНК-pol ВПГ-1 конкатемерной ДНК в капсид с последующим ее нарезанием на единичные геномы и обеспечение этих процессов необходимой энергией [14]. В соответствии с предложенной нами моделью механизма действия LAS-131 этот препарат нарушает упаковку ДНК, ингибируя активность упаковочного биомотора, формируемого pUL15 в составе терминального комплекса [13]. Логично предположить, что снижение эффективности ингибирования синтеза ДНК при снижении концентрации исследованных модифицированных нуклеозидов или ФОС в комбинации компенсируется снижением эффективности упаковки ДНК в вирусный капсид и наоборот, снижение эффективности упаковки ДНК при снижении в комбинации концентрации LAS-131 нивелируется более эффективной супрессией синтеза ДНК ингибиторами ДНК-pol.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- James C., Harfouche M., Turner K.M., et al. Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016 // *Bulletin of the World Health Organ.* 2020, Vol. 98, № 5, P. 315–329.
- Das D., Hong J. Chapter 12. *Herpesvirus Polymerase Inhibitors*. In: Gupta, S.P., editor. *Viral Polymerases: Structures, Functions and Roles as Antiviral Drug Targets* London: Academic Press; 2019. P. 333–356.
- Garikapati S., Nguyen M. Foscarnet [Internet]. *Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing*; 2023.
- Drug Monograph Cidofovir [Internet]. Elsevier: Content from Elsevier's drug information, 2023.
- Андропова В.Л. Современная этиотропная химиотерапия герпесвирусных инфекций: достижения, новые тенденции и перспективы. Альфа-герпесвирусы (часть II) // *Вопросы вирусологии*. 2018. Т. 63, № 4. С. 149–159.
- Birkmann A., Zimmermann H. HSV antivirals – current and future treatment options // *Current Opinion in Virology* // 2016. Vol. 18. P. 9–13.
- Menéndez-Arias L., Delgado R. Update and latest advances in antiretroviral therapy // *Trends in Pharmacological Sciences*. 2022, Vol. 43, № 1. P. 16–29.
- Sarrazin C. The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice // *Journal of Hepatology*. 2016. Vol. 64, № 2. P. 486–504.
- Jones J.C., Yen H.-L., Adams P., et al. Influenza antivirals and their role in pandemic preparedness // *Antiviral Research*. 2023. Vol. 210. P. 105499.
- Beigel J.H., Bao Y., Beeler J., et al. Oseltamivir, amantadine, and ribavirin combination antiviral therapy versus oseltamivir monotherapy for the treatment of influenza: a multicentre, double-blind, randomised phase 2 trial // *The Lancet Infectious Diseases*. 2017. Vol. 17, № 12. P. 1255–1265.
- Sagnier S., Poli M., Debruxelles S., et al. High-dose acyclovir combined with foscarnet (foscarnet) in the management of severe herpes simplex virus meningoencephalitis // *Revue Neurologique (Paris)*. 2017. Vol. 173, № 4. P. 240–242.
- Krasnov V.P., Musiyak V.V., Vozdvizhenskaya O.A., et al. N-[ω-(Purin-6-yl)aminoalkano] derivatives of chiral heterocyclic amines as promising anti-herpesvirus agents // *European Journal of Organic Chemistry*. 2019. Vol. 2019. Issue 30. P. 4811–4821.
- Krasnov V.P., Andronova V.L., Belyavsky A.V., et al. Large Subunit of the Human Herpes Simplex Virus Terminase as a Promising Target in Design of Anti-Herpesvirus Agents // *Molecules*. 2023. Vol. 28, № 21. P. 7375.
- Yang Y., Yang P., Wang N., et al. Architecture of the herpesvirus genome-packaging complex and implications for DNA translocation // *Protein & Cell*. 2020. Vol. 11. № 5. P. 339–351.
- Превимис (Previmis) [Internet]. Справочник лекарственных средств Vidal.
- Maruhoreceives manufacturing and marketing approval for a partial change of the indication and dosage/administration for anti-herpes virus agent “Amenalief Tab. 200 mg” for the treatment of recurrent Herpes Simplex in Japan [Internet]. Maruho: News Release 2023.02.24.
- Shiraki K., Yasumoto S., Toyama N., et al. Amenamevir, a Helicase-Primase Inhibitor, for the Optimal Treatment of Herpes Zoster // *Viruses*. 2021. Vol. 13. № 8. P. 1547.
- Андропова В.Л., Ясько М.В., Куханова М.К., и др. Исследование подавления репродукции вируса простого герпеса с лекарственной устойчивостью сочетанием фосфита ациклогуанозина с некоторыми противогерпетическими препаратами // *Вопросы вирусологии*. 2014. Т. 59, № 6. С. 32–35.

19. Poole C.L., James S.H. Antiviral Therapies for Herpesviruses: Current Agents and New Directions // Clinical Therapeutics. 2018. Vol. 40, № 8. P. 1282–1298.
20. Van Roon E.N., Flikweert S., Le Comte M., et al. Clinical Relevance of Drug-Drug Interactions: A structured assessment procedure // Drug Safety Journal. 2005. Vol. 28, № 12. P. 1131–1139.

COMBINED EFFECT OF BASIC ANTIHERPETIC DRUGS WITH A NEW INHIBITOR OF THE TERMINASE COMPLEX OF HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 1 IN VERO CELL CULTURE

V. L. Andronova^{a, #}, G. A. Galegov^a, O. A. Vozdvizhenskaya^b,
G. L. Levit^b, V. P. Krasnov^b, Academician of the RAS V. N. Charushin^b

^aFSBI “National Research Center for Epidemiology and Microbiology
named after the honorary academician N.F. Gamaleya” of the Ministry of Health of Russia,
Moscow, Russian Federation

^bFSBIN “I.Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis”, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
Ekaterinburg, Russian Federation

[#]e-mail: andronova.vl@yandex.ru

More than 90% of the world's population are carriers of herpes simplex virus type 1 (HSV-1). The infection manifests itself in the formation of blisters and ulcers on the face or genitals, and can cause blindness, encephalitis, and generalized infection. All modern first- and second-line antiherpetic drugs selectively inhibit viral DNA-polymerase. The purine-benzoxazine conjugate LAS-131 [(S)-4-[6-(purin-6-yl)aminohexanoyl]-7,8-difluoro-3,4-dihydro-3-methyl-2H-[1,4]benzoxazine], which we described earlier, uses the large subunit of the HSV-1 terminase complex as a biotarget and selectively inhibits its reproduction in vitro. For the first time, we have obtained fundamentally new results on the combined effect of LAS-131 on human herpesvirus infection with practically significant antiviral compounds — nucleoside analogues (acyclovir [ACV], penciclovir [PCV], ganciclovir [GCV], brivudine [BVDU], iododeoxyuridine [IDU], adenine arabinoside [Ara-A], as well as a nucleoside phosphonate analogue (cidofovir [CDV]) and a pirophosphate analogue (foscarnet [FOS]). Using a inhibition assay of cytopathic effect (CPE) induced by a virus, it was shown that when combined with LAS-131, the concentrations of the compounds in combinations providing inhibition of HSV-1-induced CPE by 50%, decreased by 2 times (additive effect, FOS) or more (synergistic effect, ACV, PCV, GCV, IDU, BVDU, Ara-A, CDV). Reducing the concentrations of agents creates non-permissive conditions for the reproduction of HSV-1 and opens up new real possibilities for controlling human herpesvirus infection.

Keywords: herpes simplex virus type 1, purine-benzoxazine conjugate, antiviral drugs, antiviral drug resistance, combined therapy

УДК 593.99

СОДЕРЖАНИЕ И ПОВЕДЕНИЕ КИШЕЧНОДЫШАЩЕГО *SACCOGLOSSUS MERESCHKOWSKII* (HEMICHORDATA, ENTEROPNEUSTA) В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

© 2024 г. А. И. Лукиных¹, О. В. Ежова^{1,*}, Д. А. Ключихина¹, О. М. Катанова¹,
академик РАН В. В. Малахов¹

Поступило 25.03.2024 г.

После доработки 03.04.2024 г.

Принято к публикации 07.04.2024 г.

Описана конструкция бокса, позволяющего содержать кишечнодышащее *Saccoglossus mereschkowskii* в лабораторных условиях в течение 60 суток и осуществлять наблюдения за его поведением и питанием. Локомоция и постройка норки в грунте обеспечиваются перистальтическими движениями хоботка, периодически меняющего форму с цилиндрической на грибообразную, и наоборот. Черви строят U-образные норки, связанные боковыми анастомозами с норками соседних особей, благодаря чему в слое осадка глубиной до 8 см формируется разветвленная система ходов. Отмечено значение такой системы ходов кишечнодышащих для аэрирования верхних слоев осадка. При питании хоботок высовывается из переднего отверстия норки и протягивается по поверхности осадка. Органические частицы приклеиваются к слизи, выделяемой покровным эпителием хоботка, и транспортируются за счет биения ресничек к борозде между воротником и хоботком, где находится рот.

Ключевые слова: роющая локомоция, норки, биотурбация, мукоцилиарное питание, фотографии, видеозапись

DOI: 10.31857/S2686738924040096

Кишечнодышащие (Enteropneusta) — морские червеобразные животные, относящиеся к типу Hemichordata. Кишечнодышащие имеют черты, сближающие их с хордовыми животными, такие как жаберные щели, нервная трубка, буккальный дивертикул (стомохорд) и др. В связи с этим все особенности строения, развития и биологии кишечнодышащих вызывают большой интерес. Биология кишечнодышащих изучена очень слабо, так как большинство представителей этого класса (кроме глубоководных Torquaratoridae) обитают в норках в толще грунта и практически ненаблюдаемы. Ранее предпринимались попытки содержать в лабораторных условиях представителей двух родов кишечнодышащих: *Saccoglossus kowalevskii* [1–4] и *Glandiceps hacksi* [5]. Их содержали в пластиковых контейнерах с грунтом, взятым из места сбора животных, а сами контейнеры помещали в проточный аквариум. При этом грунт приходилось менять ежедневно, а в воду добавлять антибиотик [4–6]. В этих условиях особи *S. kowalevskii* выживали

не более 14 суток, тогда как особи *G. hacksi* сохраняли жизнеспособность около полугода. Подобные методы позволяли сохранять кишечнодышащих для изучения строения, развития и экспериментальных исследований, но не позволяли наблюдать поведение животного, скрытого в грунте.

Задачей настоящего исследования стала разработка метода длительного содержания представителя кишечнодышащих *Saccoglossus mereschkowskii* (Wagner, 1885) и наблюдение за его поведением в толще грунта.

Материал был собран в окрестностях Беломорской биологической станции МГУ имени Н.А. Перцова в летние месяцы 2023 года. *S. mereschkowskii* — червеобразные животные длиной до 8 см и около 2 мм в диаметре, обитающие на илисто-песчаных грунтах в верхней сублиторали на глубинах от 0 до 12 м. Пробы грунта, содержащие норки кишечнодышащих, были собраны во время отлива на глубине менее 1 м. Чтобы получить неповрежденных животных, пробы грунта помещали в глубокие пластиковые кюветы, размывали содержащийся в кювете субстрат и вручную извлекали сложенные из песчинок трубки с червями. Применение ранее описанных методик [1–4] в отношении

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

*e-mail: olga_ejova@mail.ru

Таблица 1. Результаты содержания *Saccoglossus mereschkowskii* в лабораторных условиях

Место содержания	Пластиковый контейнер в проточном морском аквариуме (ББС МГУ)	Узкий бокс из двух стекол в проточном морском аквариуме (ББС МГУ)	Узкий бокс из двух стекол в морском аквариуме (Москва)
Условия содержания	$+14\pm 1^{\circ}\text{C}$, 26–28‰	Дополнительная аэрация, $+14\pm 1^{\circ}\text{C}$, 26–28‰	Дополнительная аэрация, $+4^{\circ}\text{C}$, 28‰
Количество особей	4	7	3
Время сохранения живых особей	6 суток	Минимум 12 суток	60 суток

S. mereschkowskii оказалось неудачным. Черви, помещенные в проточный аквариум в пластиковом контейнере глубиной 5 см с грунтом, выползали на поверхность грунта и погибали на 6-е сутки (табл. 1).

Удачным оказалось содержание животных в боксе оригинальной конструкции. Бокс был собран из двух стеклянных пластинок толщиной 0,3 см, скрепленных так, чтобы между пластинками оставалось пространство шириной в 1 см (рис. 1).

По нижней и боковым сторонам бокса были вставлены небольшие деревянные бруски. Снаружи по периметру эти три стороны были обклеены мелкоячеистым мельничным газом. Пространство между стеклами было заполнено грунтом, взятым из местообитания кишечнодышащих *S. mereschkowskii*. В одном боксе содержалось 3 особи кишечнодышащих, в другом 4 особи. Боксы с грунтом и животными были помещены в аквариум с проточной морской водой, в котором поддерживалась температура $14\pm 1^{\circ}\text{C}$ и соленость 26–28‰ с дополнительной аэрацией. Жизнедеятельность особей *S. mereschkowskii* фиксировалась на видеокамеру Olympus TG-6 в режиме “Timelapse” с частотой 1 кадр в 2 секунды. Для этого бокс с животными переносили в аквариум шириной 5 см. По завершении фото- и видеосъемки бокс возвращали в аквариум с проточной морской водой. В описанных условиях кишечнодышащих содержали 12 суток, затем животных поместили в фильтрованную морскую воду, охлажденную до 4°C , для транспортировки и последующего содержания. В таких условиях удалось содержать *S. mereschkowskii* в течение 60 суток (табл. 1), что позволило сделать наблюдения над двигательной активностью животного, строением норки и поведением, связанным с питанием.

Добытые из естественной среды неповрежденные животные были помещены в бокс на поверхность грунта и через 20 минут все особи оказались зарывшимися в грунт (рис. 2). Конструкция бокса предоставляет возможность наблюдать, фотографировать и производить видеосъемку локомоторной активности *S. mereschkowskii* в толще осадка. При прокладывании хода кишечнодышащего в грунте главную роль играет хоботок, который функционирует как поршень переменного диаметра. Рытье норки состоит из двух фаз. Первая фаза — это пробивание

первоначального хода в осадке. В этой фазе хоботок имеет форму цилиндра, который производит толкающие движения, пробивая ход в грунте. Вторая фаза — это расширение хода и удаление из образовавшейся полости осыпавшегося песка. Оно также производится хоботком, который принимает для этого грибообразную форму (рис. 3). Передняя часть хоботка расширяется в виде шайбы с депрессией на переднем конце (“шляпка гриба”), тогда как задняя часть хоботка представляет собой стержень меньшего диаметра (“ножка гриба”). При движении вперед хоботок расширяет ход, а при движении назад отгребаёт из образовавшейся полости осыпавшийся песок. Эти движения возможны благодаря тому, что позади основания хоботка находится задний якорь, не позволяющий телу смещаться назад при движениях хоботка. Функцию заднего якоря выполняет плотный воротник, имеющий форму муфты постоянного диаметра. Благодаря грибообразной форме хоботка, совершающего поступательные движения во второй фазе, и наличию заднего якоря, *S. mereschkowskii* постепенно продвигается вперед. Прodelанный ход

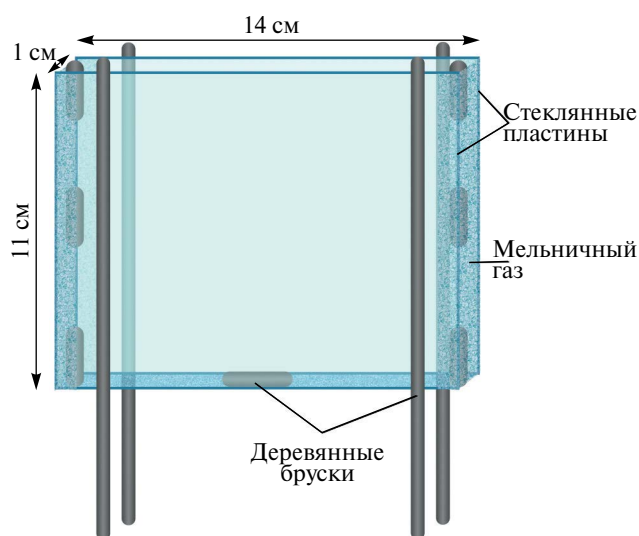


Рис. 1. Схема стеклянного бокса для содержания и наблюдения живых особей *Saccoglossus mereschkowskii*.

превращается в норку за счет того, что его стенки укрепляются слизью, которая выделяется эпидермальными железами воротника [7, 8]. Длинное туловище животного пассивно тянется за хоботком и воротником.

Меняя направление движения, *S. mereschkowskii* строит в толще осадка U-образные норки (рис. 2) с двумя отверстиями — передним и задним. Песчаные стенки норок не осыпаются, так как укреплены слизью. Видеорегистрация позволяет установить, что строительство одной U-образной норки занимает около 1,5 часов. Построенная норка сохраняется в течение 5–8 дней. Высота норок от отверстий до дна U-образного изгиба составляет 5–8 см, а ширина ходов соответствует диаметру хоботка *S. mereschkowskii*, т.е. составляет 3–5 мм, в зависимости от размера особи. Через переднее отверстие U-образной норки животное высовывает хоботок для сбора пищевых частиц с поверхности осадка. Через заднее отверстие норки на поверхность грунта выбрасываются фекальные шнуры. Нередко норка имеет не одно, а несколько передних отверстий. Помимо U-образных норок *S. mereschkowskii* строят в толще осадка спиральные ходы и боковые ответвления. Благодаря образованию боковых ходов, возникают анастомозы, через которые черви способны проникать в норки, построенные соседними особями (рис. 2). Таким образом, можно предполагать, что в естественных условиях *S. mereschkowskii* формирует трехмерную сеть ходов, пронизывающую верхний слой осадка по меньшей мере до глубины 8 см. Это обеспечивает биотурбацию и аэрирование верхних слоев грунта.

В процессе питания червь высовывает хоботок из переднего отверстия норки сначала вверх (рис. 2), затем опускает его на поверхность грунта и вытягивает, “пропахивая” самый верхний слой осадка. Длина хоботка при этом может увеличиваться в 6–8 раз. За счет биения ресничек частицы



Рис. 2. Три особи *Saccoglossus mereschkowskii* в боксе между двумя стеклами для прижизненного наблюдения. Масштаб: 2 см.

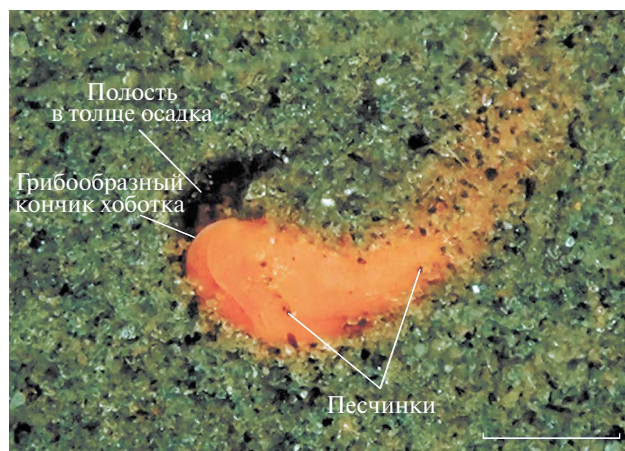


Рис. 3. Хоботок *Saccoglossus mereschkowskii*, проделывающий ход в толще песчаного грунта. Масштаб: 1 мм.

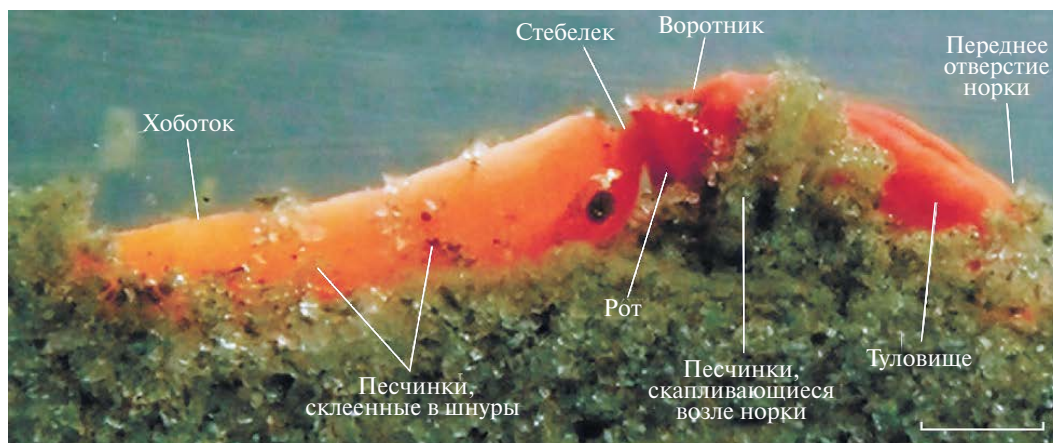


Рис. 4. Хоботок *Saccoglossus mereschkowskii*, простирающийся вдоль поверхности грунта для питания. Масштаб: 1 мм.

грунта, склеенные слизью эпидермальных желез, двигаются вдоль хоботка от его переднего конца к основанию в составе слизистых шнуров (рис. 4). При этом мелкие (не более 30 мкм) и легкие частицы детрита по борозде между хоботком и воротником направляются к ротовому отверстию. Более крупные частицы либо не удерживаются на хоботке, либо продвигаются вдоль тела червя дальше назад, не попадая в борозду между хоботком и воротником. Каждые 3–5 минут червь меняет направление вытягивания хоботка, собирая таким образом пищевые частицы с разных сторон от отверстия норки.

Как известно, хоботок является главным локомоторным органом роющих кишечнодышащих [9]. В ранее опубликованных работах [10, 11] указано, что роющая активность кишечнодышащих осуществляется за счет перистальтических сокращений продольной мускулатуры хоботка, однако конкретная последовательность движений органа в толще грунта оставалась неизвестной. Рао [12] и Риттер [11] отмечали ведущую роль ресничной активности, которая обеспечивает движение частиц осадка по телу кишечнодышащих. Мукоцилиарный механизм питания, характерный для кишечнодышащих, у представителей семейств Ptychoderidae и Harrimaniidae реализуется с использованием хоботка [13, 14]. Глубоководным кишечнодышащим из семейства Torquaratoridae также свойственно мукоцилиарное суспензионное питание, однако оно осуществляется с использованием боковых разрастаний воротника — так называемых “латеральных губ” [15].

Проведенные нами эксперименты показали, что применение бокса в виде двух пластинок позволяет успешно длительно содержать *S. mereschkowskii* в лабораторных условиях и дает возможность осуществлять наблюдения за движением и питанием кишечнодышащих.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность коллективу Беломорской биологической станции МГУ им. Н.А. Перцова. Исследование осуществлено в рамках деятельности студенческой лаборатории эволюционной морфологии животных (www.evolmorph.ru) кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Авторы благодарны профессору кафедры зоологии беспозвоночных Н.Н. Марфенину (биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова) за ценные рекомендации и поддержку.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ 23–14–00047.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы использования животных были соблюдены. В соответствии с пунктом 3 главы 1 Директивы 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях, требования биоэтики не распространяются на объект данного исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

У авторов нет финансовых или каких-либо иных конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miller D.C. Response of *Saccoglossus kowalevskii* (Phylum Hemichordata, Class Enteropneusta) to changes in diet // Marine Ecology Progress Series. 1992. Vol. 87. P. 41–54.
2. Fielman K.T., Targett N.M. Variation of 2,3,4-tribromopyrrole and its sodium sulfamate salt in the hemichordate *Saccoglossus kowalevskii* // Marine Ecology Progress Series. 1995. Vol. 116. P. 125–136.
3. Giray C., King G.M. Predator deterrence and 2,4-dibromophenol conservation by the enteropneusts *Saccoglossus bromophenolosus* and *Protoglossus graveolens* // Marine Ecology Progress Series. 1997. Vol. 159. P. 229–238.
4. Lowe C.J., Tagawa K., Humphreys T., et al. Hemichordate embryos: procurement, culture, and basic methods // Methods in Cell Biology. 2004. Vol. 74. P. 171–194.
5. Urata M., Iwasaki S., Ohtsuka S. Biology of the swimming acorn worm *Glandiceps hacksi* from the Seto Inland Sea of Japan // Zoological Science. 2012. Vol. 29(5). P. 305–310.
6. Gonzalez P., Jiang J.Z., Lowe C.J. The development and metamorphosis of the indirect developing acorn worm *Schizocardium californicum* (Enteropneusta: Spengelidae) // Frontiers in Zoology. 2018. Vol. 15(26). P. 1–24.
7. Van der Horst C.J. Observations on some Enteropneusta // Videnskabelige meddelelser fra Dansk Naturhistorisk Forening i København. 1929. Vol. 87. P. 135–200.
8. Spengel J.W. Die Enteropneusten des Golfes von Neapel und der angrenzenden Meeres-Abschnitte. Fauna und Flora des Golfes von Neapel. Herausgegeben von der Zoologischen Station zu Neapel 18. Monograph. Berlin: Verlag von R. Friedländer & Sohn. 1893.
9. Hyman L.H. The Invertebrates: small coelomate groups. New York: McGraw-Hill Book Co. 1959. Vol. 5. P. 72–207.
10. Knight-Jones E.W. On the nervous system of *Saccoglossus cambrensis* (Enteropneusta) // Philosophical

- Transactions of the Royal Society of London. 1952. Vol. 236B. P. 315–354.
11. Ritter W.E. The movements of the Enteropneusta and the mechanism by which they are accomplished // Biological Bulletin. 1902. Vol. 3. P. 255–261.
 12. Rao K.P. Bionomics of *Ptychodera flava* Eschscholtz (Enteropneusta) // Journal of Madras University. Sect. B. 1954. Vol. 24. P. 1–5.
 13. Barrington E.J.W. Observations on feeding and digestion in *Glossobalanus minutus* // Quarterly Journal of Microscopical Science. 1940. Vol. 82. P. 227–260.
 14. Knight-Jones E.W. Feeding in *Saccoglossus* (Enteropneusta) // Proceedings of the Zoological Society of London. 1953. Vol. 123. № 3. P. 637–654.
 15. Ezhova O.V., Trukhan M.A., Lukinykh A.I., et al. Digestive system and feeding of deep-sea acorn worm *Quatuorallisia malakhovi* (Enteropneusta: Torquaratoridae) from the Bering sea // Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers. 2024. Vol. 203. 104196.

KEEPING AND BEHAVIOUR OF AN ACORN WORM *SACCOGLOSSUS MERESCHKOWSKII* (HEMICHORDATA, ENTEROPNEUSTA) IN LABORATORY CONDITIONS

A. I. Lukinykh^a, O. V. Ezhova^{a, #}, D. A. Klochikhina^a, O. M. Katanova^a,
Academician of the RAS V. V. Malakhov^a

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

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

The design of the box is described, which allows to keep the acorn worm *Saccoglossus mereschkowskii* in laboratory conditions for 60 days and to observe its behavior and feeding. The locomotion and constructing of the burrows in the sediment are provided by peristaltic movements of the proboscis, which periodically changes its shape from cylindrical to mushroom-like, and vice versa. Worms build U-shaped burrows connected by flank anastomoses with the burrows of neighboring specimens. As a result, a branched system of passages is formed in a sediment layer up to 8 cm deep. The importance of such a system of enteropneust's passages for aerating the upper layers of sediment is noted. When feeding, the proboscis sticks out from the anterior opening of the burrow and stretches along the surface of the sediment. Organic particles adhere to the mucus secreted by the epidermal epithelium of the proboscis, and are transported by ciliary beating to the furrow between the collar and proboscis, where the mouth is located.

Keywords: Burrowing locomotion, burrows, bioturbation, mucous-ciliary feeding, photos, video recording

УДК 575.22:595.773.4

ВЛИЯНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ SU(HW)-ЗАВИСИМЫМИ ИНСУЛЯТОРАМИ НА ЭФФЕКТ ТРАНСВЕКЦИИ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2024 г. Л. С. Мельникова^{1,*}, В. В. Молодина¹,
академик РАН П. Г. Георгиев¹, А. К. Головин¹

Поступило 20.02.2024 г.

После доработки 15.03.2024 г.

Принято к публикации 17.03.2024 г.

Трансвекция — явление межallelельной коммуникации, при которой энхансеры могут активировать специфичный промотор, расположенный на гомологичной хромосоме. Значительную роль в обеспечении функциональных взаимодействий между энхансерами и промоторами играют инсуляторы. В представленной работе мы смоделировали ситуацию, когда рядом с локализованными на гомологичных хромосомах энхансерами и промоторами находятся две или три копии инсулятора. На примере инсулятора Su(Hw) мы показали, что функциональное взаимодействие между парой инсуляторов способствует энхансер-промоторным транс-взаимодействиям. Взаимодействие между тремя инсуляторами, наоборот, может приводить к формированию хроматиновых петель стерически препятствующих полноценному энхансер-промоторному взаимодействию. Результаты работы позволяют предположить участие инсуляторов в регуляции гомологичного спаривания хромосом и в коммуникации между удаленными геномными локусами.

Ключевые слова: гомологичное спаривание хромосом, энхансер-промоторные взаимодействия, инсулятор, Su(Hw), регуляция транскрипции

DOI: 10.31857/S2686738924040101

Энхансер-зависимая активация является основным механизмом регуляции транскрипции генов у эукариот. Энхансеры могут активировать специфичные промоторы на расстояниях, достигающих сотен т.п.н., не затрагивая при этом соседние гены [1]. Функциональное взаимодействие между энхансерами и промоторами контролируют инсуляторы и коммуникаторные элементы, поддерживающие специфичные дистанционные взаимодействия [2]. Однако механизмы формирования и поддержания дистанционных взаимодействий между регуляторными элементами генома остаются плохо изученными.

Ключевую роль в своевременной и тканеспецифичной активации генов, определяющих развитие эукариот играет архитектура хроматина [3]. Архитектурный/инсуляторный белок Su(Hw), описанный у *Drosophila* одним из первых, содержит двенадцать цинковых пальцев C2H2 (домены

C2H2) и связывается с 12 сайтами в 5'-регуляторной области ретротранспозона *gypsy* (МДГ4) [4]. Домены C2H2 от 6 до 10 участвуют в специфическом связывании с мотивом ДНК длиной 15 п.н. [5].

Две консервативные области на N-конце белка Su(Hw) взаимодействуют с ВТВ (Broad-complex, Tramtrack и Bric-à-brac) доменом белка CP190 [6]. Также с белком CP190 напрямую взаимодействуют многие другие архитектурные белки C2H2 дрозофилы [7]. CP190 преимущественно связывается с промоторами генов и необходим для поддержания открытой структуры хроматина [8].

На С-конце белка Su(Hw) картирована область, взаимодействующая с одной из более чем 30 изоформ белка Mod(mdg4) [9,10]. Все изоформы Mod(mdg4) имеют на N-конце ТТК (Tramtrack)-подобный домен ВТВ, способный образовывать гексамеры [11]. Уникальный С-конец изоформы Mod(mdg4)-67.2 взаимодействует исключительно с С-концевым доменом белка Su(Hw) [9,10]. Белки CP190 и Mod(mdg4)-67.2 одновременно необходимы для активности Su(Hw)-зависимого комплекса и его рекрутирования в хроматин [10]. Было показано, что искусственные повторяющиеся сайты

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

*e-mail: lsm73@mail.ru

связывания белка Su(Hw) или *gypsy* инсультатор могут формировать хроматиновые петли, которые либо блокируют энхансер-промоторные взаимодействия, либо, наоборот, способствуют сближению энхансера со специфичным промотором и стимуляции транскрипции [12].

Трансквекция — явление межallelельной коммуникации, посредством которой энхансеры одного аллеля могут активировать промотор, расположенный на гомологичной хромосоме [13]. Ранее было показано, что взаимодействующие инсультаторы *gypsy* эффективно стабилизируют энхансер-промоторные взаимодействия в случае трансквекции в локусе *yellow* [14]. Однако в предыдущих исследованиях трансгены встраивали в случайные места генома с помощью вектора на основе мобильного *P*-элемента [14]. Поэтому в ряде случаев эффект взаимодействия инсультаторов мог искажаться влиянием окружающего хроматина. Так, на трансгенных конструкциях с различным расположением регуляторных элементов было показано, что два или три инсультатора Su(Hw), расположенные на одной хромосоме, могут взаимодействовать друг с другом на значительных расстояниях, через расположенные между ними энхансеры или промоторы и кодирующие последовательности, при этом оказывая совершенно разные эффекты на транскрипцию модельных генов. В зависимости от расположения инсультаторов в трансгене и расстояния между ними и регуляторными элементами блокирование энхансера может быть ослаблено, отменено или восстановлено [12].

Целью представленной работы стало изучение влияния двух или трех взаимодействующих инсультаторов Su(Hw), не опосредованного окружающим хроматином, на транс-взаимодействия между энхансерами и специфичными промоторами. В качестве репортеров мы использовали ген *yellow*, отвечающий за пигментацию кутикулы тела и крыльев [15], и ген *white*, обеспечивающий пигментацию глаз [16]. Инактивация генов *yellow* и *white* не влияет на жизнеспособность мух, а уровень их экспрессии можно с высокой точностью определить визуально. В кутикуле тела и крыльях транскрипция *yellow* контролируется энхансерами, расположенными на расстоянии 1100 п.н. от промотора [15]. Они определяют темную окраску тела и крыльев, а также черную окраску двух последних брюшных сегментов (A5 и A6) у самцов. В отсутствие энхансеров гена *yellow* или при их блокировке инсультатором *gypsy* в аллеле y^2 [17] тело и крылья мух желтые, а два брюшных сегмента самцов становятся светло-коричневыми (базовый уровень активации). Степень пигментации тела и крыльев напрямую коррелирует с эффективностью активации гена *yellow* энхансерами и оценивается по шкале от 1 до 5 [6]. Транскрипция гена *white* в глазном имажинальном диске контролируется специфичным

для глаз энхансером, расположенным на 1150 п.н. выше промотора [16]. Базальная экспрессия гена *white* в трансгенах обычно варьирует от желтого до оранжевого. В присутствии энхансера глаз возрастание экспрессии гена *white* коррелирует с усилением пигментации глаз до темно-коричневого или красного цвета. В трансгенах мы использовали стандартный ген *mini-white* (далее — *white*), у которого удален первый интрон.

Мы сконструировали три трансгена, каждый из которых содержал сайт *attB* и искусственно созданные последовательности для связывания белка Su(Hw) (S^{x4}) [18], окруженные сайтами *loxP*. Трансгены $S^{x4}EyS^{x4}$ и $ES^{x4}y$ включали энхансер глаз (E), окруженный сайтами *FRT* и репортерный ген *yellow* (y). Трансген $WBS^{x4}w$ включал окруженные сайтами *FRT* энхансеры тела и крыльев (WB) и репортерный ген *white* (w) (рис. 1). С помощью $\phi C31$ -зависимой рекомбинации [19] все трансгены были интегрированы в геномный район 2R:11890256 линии y^1w^{1118} с полностью инактивированными генами *yellow* и *white*, в интрон гена *ERp60*, куда предварительно был интегрирован сайт *attP*. Согласно данным Chorogenome Navigator (<http://chorogenome.ie-freiburg.mpg.de/>), этот район относится к транскрипционно активному хроматину и не содержит эндогенные сайты для связывания

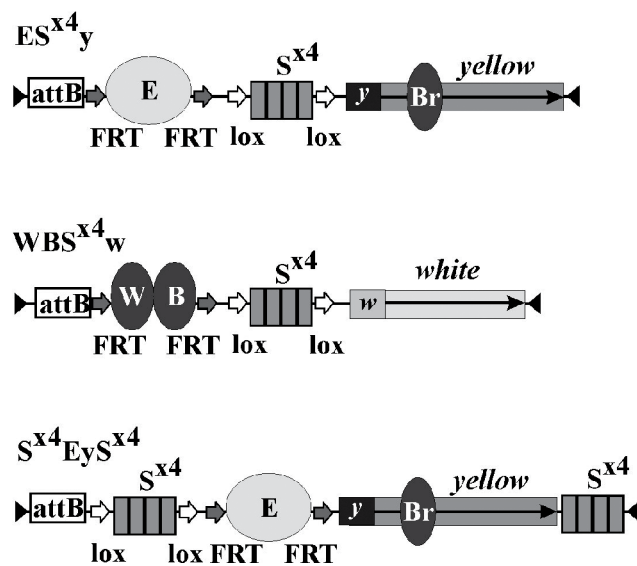


Рис. 1. Схематичное изображение трансгенов (Schematic representation of transgenes). Над каждой схемой указано название трансгена. Сайт *attB* изображен в виде прямоугольника и подписан. Сайты связывания белка Su(Hw) (S^{x4}) — вертикальные прямоугольники; энхансеры глаз (E), щетинок (Br), крыловых пластин (W) и тела (B) — овалы; сайты *FRT* и *loxP* — горизонтальные стрелки; промоторы генов *yellow* (y) и *white* (w) — квадраты внутри прямоугольников, изображающих гены, направление транскрипции которых обозначено стрелкой.

Таблица. 1. Оценка фенотипов *yellow* (тело и крылья) и *white* (глаза) в трансгенных линиях (Evaluation of *yellow* (body and wings) and *white* (eyes) phenotypes in transgenic lines)

Генотип	Фенотип		
	тело	крылья	глаза
$S^{\times 4}EyS^{\times 4}/+$	2	2	белые
$ES^{\times 4}y/+$	2	2	белые
$WBS^{\times 4}w/+$	1	1	желтые
$ES^{\times 4}y/WBS^{\times 4}w$	5	5	красные
$\Delta ES^{\times 4}y/\Delta WBS^{\times 4}w$	2	2	желтые
$ES^{\times 4}y/+;su(Hw)^v/su(Hw)^2$	2	2	белые
$WBS^{\times 4}w/+;su(Hw)^v/su(Hw)^2$	1	1	желтые
$ES^{\times 4}y/WBS^{\times 4}w;su(Hw)^v/su(Hw)^2$	3	4	оранжевые
$ES^{\times 4}y/WB\Delta S^{\times 4}w$	3	4	красно-коричневые
$WBS^{\times 4}w/S^{\times 4}EyS^{\times 4}$	3	4	красные
$\Delta WBS^{\times 4}w/S^{\times 4}\Delta EyS^{\times 4}$	2	2	желтые
$WBS^{\times 4}w/S^{\times 4}EyS^{\times 4};su(Hw)^v/su(Hw)^2$	3	4	оранжевые
$WB\Delta S^{\times 4}w/S^{\times 4}EyS^{\times 4}$	2	2	желтые
$WBS^{\times 4}w/\Delta S^{\times 4}EyS^{\times 4}$	4	4	коричневые
$WB\Delta S^{\times 4}w/\Delta S^{\times 4}EyS^{\times 4}$	3	4	красно-коричневые

каких-либо известных инсуляторных/архитектурных белков.

Полученные трансгенные линии были жизнеспособны и фертильны. Во всех линиях репортеры в составе конструкций экспрессировались на базовом уровне, т.е. в линиях $y^1w^{1118};S^{\times 4}EyS^{\times 4}/+$ и $y^1w^{1118};ES^{\times 4}y/+$ мухи имели белые глаза и желтые тело и крылья, а в линии $y^1w^{1118};WBS^{\times 4}w/+$ глаза мух были желтыми, а тело и крылья неокрашенными (табл. 1). Следовательно, окружающий хроматин не активировал и не репрессировал транскрипцию трансгенов.

Пигментацию тела и крыльев оценивали по пятибалльной шкале, где 1 — отсутствие транскрипции гена *yellow*; 5 — пигментация тела и крыльев на уровне дикого типа, что соответствует максимальной активации транскрипции соответствующими энхансерами; 2 — базовый уровень транскрипции, который наблюдается в отсутствии энхансеров; 3 и 4 — промежуточные уровни транскрипции в порядке возрастания. Транскрипцию гена *white* оценивали по окраске глаз мух. Белые глаза — отсутствие транскрипции; красные глаза — пигментация на уровне дикого типа, что соответствует максимальной активации транскрипции энхансером глаз; желтый, оранжевый и красно-коричневый — промежуточные уровни транскрипции в порядке возрастания.

Для изучения роли двух инсуляторов в транс-векции мы скрестили между собой линии $y^1w^{1118};ES^{\times 4}y/+$ и $y^1w^{1118};WBS^{\times 4}w/+$ (рис. 2а). В транс-гетерозиготе $ES^{\times 4}y/WBS^{\times 4}w$ мухи демонстрировали окраску глаз и кутикулярных структур дикого типа — ярко красные глаза и черные тело и крылья (табл. 1). Максимальный уровень экспрессии репортерных генов свидетельствовал, что в линии

$y^1w^{1118};ES^{\times 4}y/WBS^{\times 4}w$ энхансеры функционально взаимодействуют со специфичными промоторами и активируют транскрипцию (рис. 2б).

Чтобы выяснить, какую роль в наблюдаемой транс-активации играют формирующиеся на сайтах $S^{\times 4}$ инсуляторные комплексы, с помощью Flp-опосредованной рекомбинации мы получили производные линии с вырезанными энхансерами. Вырезание энхансеров из обоих трансгенов не влияло на фенотип мух в линиях $y^1w^{1118};\Delta ES^{\times 4}y/+$ и $y^1w^{1118};\Delta WBS^{\times 4}w/+$. В транс-гетерозиготе $\Delta ES^{\times 4}y/\Delta WBS^{\times 4}w$ оба репортерных гена экспрессировались на базовом уровне (табл. 1). Следовательно, инсуляторы $S^{\times 4}$, даже в случае взаимодействия, не способны самостоятельно активировать транскрипцию репортеров (рис. 2в).

Затем мы ввели в линию $y^1w^{1118};ES^{\times 4}y/WBS^{\times 4}w$ сочетание мутаций $su(Hw)^v/su(Hw)^2$, инактивирующих белок Su(Hw) [20]. Нокаут по белку Su(Hw) не влиял на фенотип мух в линиях $y^1w^{1118};ES^{\times 4}y/+;su(Hw)^v/su(Hw)^2$ и $y^1w^{1118};WBS^{\times 4}w/+;su(Hw)^v/su(Hw)^2$. Однако в линии $y^1w^{1118};ES^{\times 4}y/WBS^{\times 4}w;su(Hw)^v/su(Hw)^2$ мухи имели промежуточный фенотип, т.е. оранжевые глаза и более темные тело и крылья, чем в линии $y^1w^{1118};\Delta ES^{\times 4}y/\Delta WBS^{\times 4}w$ (табл. 1).

Этот результат показывает, что локализованные в одном и том же месте на гомологичных хромосомах энхансер и специфичный промотор способны взаимодействовать друг с другом, но не с максимальной эффективностью (рис. 2г). Взаимодействия между расположенными поблизости от этих регуляторных элементов инсуляторами Su(Hw) стабилизируют энхансер-промоторные взаимодействия

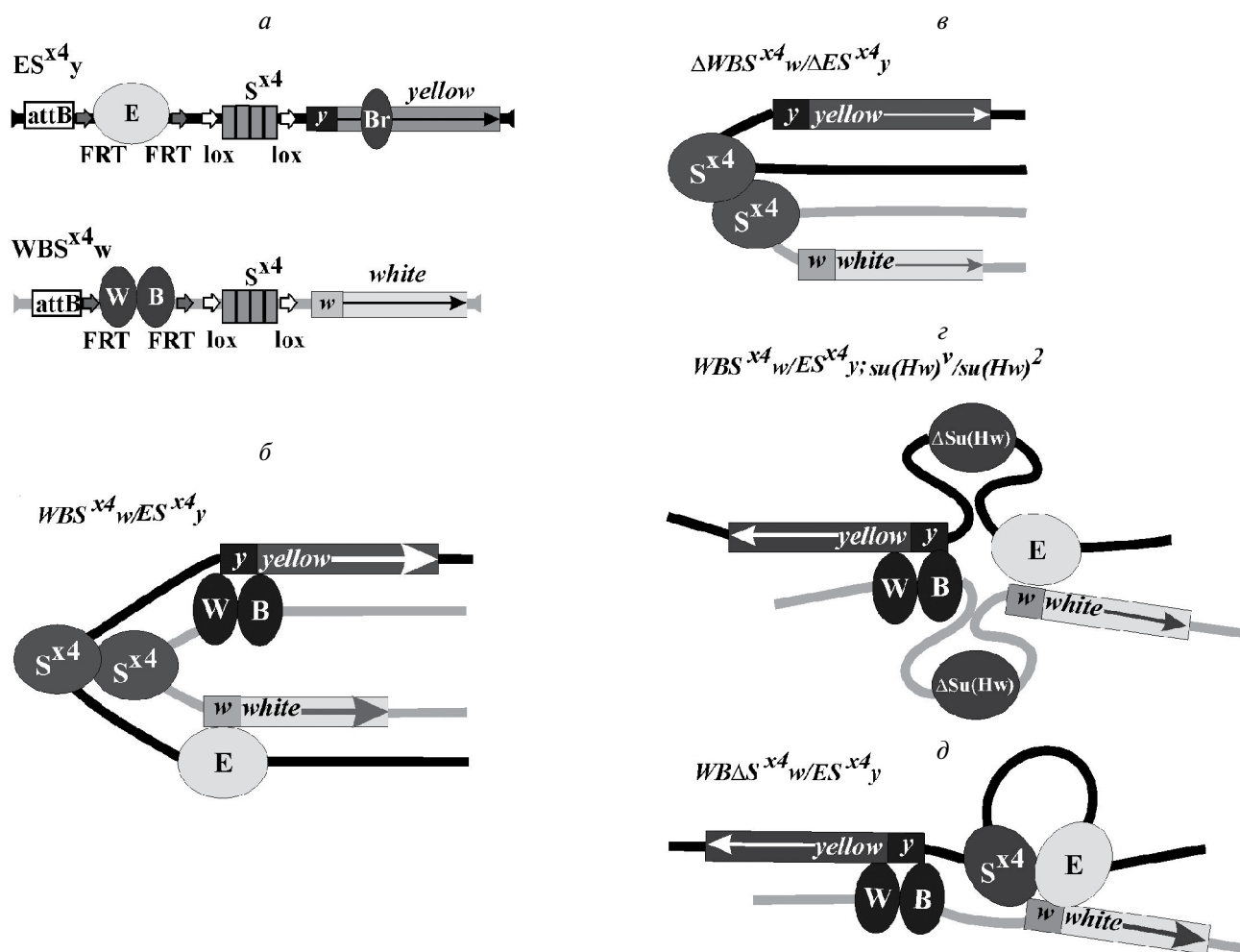


Рис. 2. Влияние взаимодействий пары инсульторов на транс-активацию модельных генов в линии $WBS^{x4}w/ES^{x4}$ и ее производных (The effect of insulators pair interactions on trans activation of model genes in the $WBS^{x4}w/ES^{x4}$ line and its derivatives). Гомологичные хромосомы изображены, как жирные черная и серая линии; $\Delta Su(Hw)$ обозначает инактивацию белка $Su(Hw)$ в результате введения в линию сочетания мутаций $su(Hw)^v/su(Hw)^2$. Остальные обозначения, как на рис. 1.

и способствуют максимальной активации экспрессии репортерных генов.

Чтобы выяснить, как взаимодействие трех $Su(Hw)$ -зависимых комплексов влияет на транс-активацию, мы скрестили между собой линии $y^1w^{1118}; WBS^{x4}w/+$ и $y^1w^{1118}; S^{x4}EyS^{x4}/+$ (рис. 3а). В транс-гетерозиготной линии $y^1w^{1118}; WBS^{x4}w/S^{x4}EyS^{x4}$ глаза мух приобрели окраску дикого типа. Однако кутикулярные структуры имели промежуточный фенотип. Окраска тела была близка к исходному фенотипу линии $y^1w^{1118}; S^{x4}EyS^{x4}/+$, крылья были окрашены в серый цвет (табл. 1).

Чтобы выявить роль энхансеров в активации каждого из репортерных генов мы скрестили между собой производные линии с делетированными энхансерами. Следствием вырезания энхансеров в полученной транс-гетерозиготе $\Delta WBS^{x4}w/$

$S^{x4}\Delta EyS^{x4}$ стало снижение транскрипции модельных генов до базового уровня (желтые глаза, светлое тело и крылья) (табл. 1). Поэтому даже 3 инсультора S^{x4} не способны самостоятельно активировать экспрессию репортеров в случае транс-взаимодействия (рис. 3б).

Далее мы изучили роль инсульторов в обеспечении энхансер-промоторных взаимодействий. Поскольку мы не могли вырезать из конструкции $S^{x4}EyS^{x4}$ сайты связывания $Su(Hw)$, расположенные на 3' конце гена *yellow*, для инактивации всех $Su(Hw)$ -зависимых комплексов мы ввели в линии модельной системы мутации $su(Hw)^v/su(Hw)^2$. В полученной линии $y^1w^{1118}; WBS^{x4}w/S^{x4}EyS^{x4}; su(Hw)^v/su(Hw)^2$ транскрипция обоих репортеров активировалась частично: окраска глаз у мух становилась оранжевой, т.е. в сравнении с взаимодействием

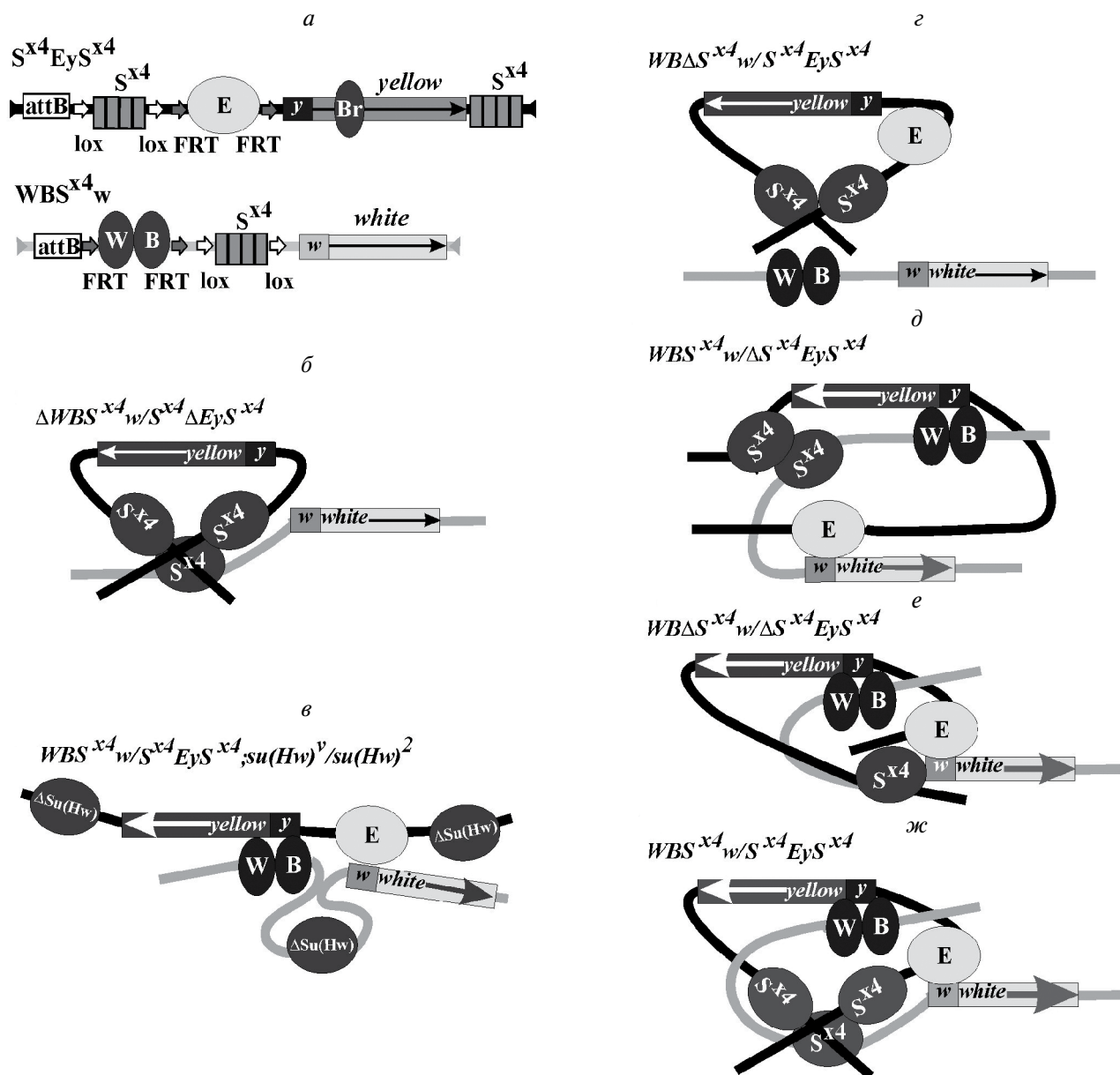


Рис. 3. Влияние взаимодействий трех инсуляторов на транс-активацию модельных генов в линии $ES^{x4}/WBS^{x4}w$ и ее производных (The effect of three insulator interactions on trans activation of model genes in the $ES^{x4}/WBS^{x4}w$ line and its derivatives). Все обозначения, как на рис. 1 и 2.

трех инсуляторов $Su(Hw)$ в линии $y^1w^{1118}; WBS^{x4}w/S^{x4}EyS$ ген $white$ активировался слабее, а окраска кутикулярных структур оставалась практически такой же (табл. 1). Этот результат подтверждает, что локализованные в одном и том же месте на гомологичных хромосомах промотор и специфичный энхансер способны взаимодействовать друг с другом (рис. 3в), однако функциональное взаимодействие между инсуляторами $Su(Hw)$ способствует энхансер-промоторным взаимодействиям.

В линии $y^1w^{1118}; WBS^{x4}w/S^{x4}EyS^{x4}$ при взаимодействии трех инсуляторов транскрипция гена $yellow$ активировалась гораздо хуже, чем транскрипция

гена $white$ (табл. 1). Чтобы изучить механизм взаимодействия между тремя инсуляторами, мы поочередно вырезали сайты S^{x4} из трансгенов и скрестили полученные производные линии.

При вырезании сайта S^{x4} , расположенного между энхансерами тела и крыльев и промотором гена $white$, фенотип мух из транс-гетерозиготной линии $y^1w^{1118}; WBS^{x4}w/S^{x4}EyS^{x4}$ был таким же, как при вырезании всех энхансеров: желтые глаза, светлые тело и крылья (табл. 1). Мы предполагаем, что взаимодействие между двумя инсуляторами в конструкции $S^{x4}EyS^{x4}$ приводит к формированию петли, которая препятствует сближению гомологичных

районов хромосом и полностью изолирует заключенные в ней ген *yellow* и энхансер глаз (рис. 3г).

При вырезании сайта S^{x4} , расположенного перед энхансером глаз, мухи из трансгетерозиготной линии $y^1w^{1118}; WBS^{x4}w/\Delta S^{x4}EyS^{x4}$ имели коричневые глаза, темное тело (темная окраска брюшных сегментов A5 и A6 у самцов) и темные крылья. Специфичные энхансеры активировали экспрессию репортерных генов, но не до уровня дикого типа (табл. 1). Вероятно, взаимодействие между инсуляторами разворачивало трансгены таким образом, что каждый из энхансеров оказывался на 3' конце специфичного гена. Такая ориентация энхансеров и промоторов пропорционально снижала активацию обоих репортеров (рис. 3д).

В трансгетерозиготе $WB\Delta S^{x4}w/\Delta S^{x4}EyS^{x4}$ сайты связывания Su(Hw), расположенные перед специфичными энхансерами, были делетированы в обоих трансгенах. В этом случае мы наблюдали частичную активацию транскрипции обоих репортеров: окраска глаз у мух приближалась к дикому типу, т.е. в сравнении с линией $y^1w^{1118}; WBS^{x4}w/S^{x4}EyS^{x4}; su(Hw)^v/su(Hw)^2$ ген *white* активировался сильнее, а окраска кутикулярных структур оставалась практически такой же (табл. 1). Следовательно, присутствие сайта S^{x4} на 3' конце гена *yellow* в линии $y^1w^{1118}; WB\Delta S^{x4}w/\Delta S^{x4}EyS^{x4}$ позволяет энхансеру глаз более эффективно взаимодействовать с промотором *white* (рис. 3е). Возможно, в отсутствие инсуляторов-партнеров сайт S^{x4} непосредственно взаимодействует с промотором гена *white*, что либо стабилизирует энхансер-промоторное взаимодействие, либо инсулятор непосредственно активировал экспрессию *white*. При этом ген *yellow* оказывается внутри петли, сформированной энхансером глаз, промотором гена *white* и сайтами S^{x4} , что препятствует полноценной активации транскрипции *yellow* энхансерами тела и крыльев (рис. 3е).

Чтобы выяснить, способен ли одиночный инсулятор Su(Hw) стимулировать трансекцию в гене *white* независимо от положения в трансгене, мы скрестили линию $y^1w^{1118}; WB\Delta S^{x4}w/+$ с линией $y^1w^{1118}; ES^{x4}y/+$, в которой инсулятор располагался вблизи энхансера глаз (рис. 2д). В линии $y^1w^{1118}; ES^{x4}y/WB\Delta S^{x4}w$ окраска тела и крыльев у мух была такой же, как в линии $y^1w^{1118}; ES^{x4}y/WBS^{x4}w; su(Hw)^v/su(Hw)^2$, т.е. сохранялось нестабильное транс-взаимодействие между энхансерами и промотором гена *yellow*. В то же время глаза были пигментированы значительно сильнее, чем при нокдауне по белку Su(Hw) (табл. 1). Следовательно, одиночный инсулятор Su(Hw), как и в трансгетерозиготе $WB\Delta S^{x4}w/\Delta S^{x4}EyS^{x4}$, способствовал стимуляции промотора гена *white* (рис. 2д).

Проанализировав полученные результаты, мы пришли к выводу, что в линии $y^1w^{1118}; WBS^{x4}w/$

$S^{x4}EyS^{x4}$ происходит взаимодействие всех трех инсуляторов Su(Hw), которое стабилизирует гомологичные хромосомы и обеспечивает непосредственный контакт между энхансером глаз и промотором гена *white*, что приводит к эффективной активации транскрипции и пигментации глаз на уровне дикого типа. При этом сайты S^{x4} в составе конструкции $S^{x4}EyS^{x4}$ формируют петлю, внутри которой оказывается ген *yellow*, что затрудняет доступ специфичных энхансеров к промотору (рис. 3ж). Кроме того, в непосредственной близости от энхансеров и промотора *yellow* располагаются взаимодействующие инсуляторные комплексы. Взаимодействие между инсуляторами нейтрализует их активность, однако большие белковые комплексы могут являться физическим препятствием для энхансер-промоторной коммуникации. Поэтому, несмотря на пространственную близость, энхансер-промоторные взаимодействия в гене *yellow* нарушены, что является причиной не полной активации транскрипции и приводит к промежуточному фенотипу (табл. 1).

Несмотря на множество примеров трансекции, механизм спаривания хромосом во время интерфазы до сих пор до конца неясен. В представленной работе мы продемонстрировали, что взаимодействие между парой Su(Hw)-зависимых инсуляторов способствует транс-активации транскрипции модельных генов специфичными энхансерами. Этот результат предполагает участие инсуляторов в регуляции гомологичного спаривания хромосом и в коммуникации между удаленными локусами. Вероятно, взаимодействия между белками, связанными с парными инсуляторными сайтами, в нашем случае с последовательностями S^{x4} , могут улучшить локальное спаривание между гомологичными хромосомами. Введение в модельную систему третьего инсулятора может привести к формированию хроматиновых петель, стерически препятствующих полноценному энхансер-промоторному взаимодействию. Эффект, который несколько взаимодействующих инсуляторов оказывают на транскрипцию, зависит от взаимного расположения инсуляторов, энхансеров и промоторов. Еще одним интересным фактом является стимуляция единичным инсулятором Su(Hw) транскрипции гена *white*, что еще раз подтверждает возможность прямого взаимодействия инсулятора с энхансером и промотором. В сумме результаты работы показывают, что инсуляторные элементы являются важным звеном, организующим транс-взаимодействия между регуляторными элементами генома.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта РФ (проект № 22-24-00719).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ
И СТАНДАРТОВ

Требования биоэтического комитета не распространяются на объект исследования, исследование человека не проводилось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hafner A., Boettiger A.* The spatial organization of transcriptional control // *Nat Rev Genet.* 2023. V. 24. № 1. P. 53–68.
2. *Kyrchanova O., Sokolov V., Georgiev P.* Mechanisms of Interaction between Enhancers and Promoters in Three Drosophila Model Systems // *Int J Mol Sci.* 2023. V. 24. № 3. P. 2855.
3. *Cavalheiro G.R., Pollex T., Furlong E.E.* To loop or not to loop: what is the role of TADs in enhancer function and gene regulation? // *Curr Opin Genet Dev.* 2021. V. 67. P. 119–129.
4. *Geyer P.K., Corces V.G.* DNA position-specific repression of transcription by a Drosophila zinc finger protein // *Genes Dev.* 1992. V. 6. № 10. P. 1865–1873.
5. *Baxley R.M., Bullard J.D., Klein M.W., et al.* Deciphering the DNA code for the function of the Drosophila polydactyl zinc finger protein Suppressor of Hairy-wing // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. № 8. P. 4463–4478.
6. *Melnikova L., Kostyuchenko M., Molodina V., et al.* Interactions between BTB domain of CP190 and two adjacent regions in Su(Hw) are required for the insulator complex formation // *Chromosoma.* 2018. V. 127. № 1. P. 59–71.
7. *Golovnin A., Melnikova L., Babosha V.* The N-Terminal Part of Drosophila CP190 Is a Platform for Interaction with Multiple Architectural Proteins // *Int J Mol Sci.* 2023. V. 24. № 21. P. 15917.
8. *Bartkuhn M., Straub T., Herold M., et al.* Active promoters and insulators are marked by the centrosomal protein 190 // *EMBO J.* 2009. V. 28. № 7. P. 877–898.
9. *Gause M., Morcillo P., Dorsett D.* Insulation of enhancer-promoter communication by a gypsy transposon insert in the Drosophila cut gene: cooperation between suppressor of hairy-wing and modifier of mdg4 proteins // *Mol Cell Biol.* 2001. V. 21. № 14. P. 4807–4817.
10. *Melnikova L., Kostyuchenko M., Molodina V., et al.* Multiple interactions are involved in a highly specific association of the Mod(mdg4)-67.2 isoform with the Su(Hw) sites in Drosophila // *Open Biol.* 2017. V. 7. № 10. P. 170150.
11. *Stogios P.J., Downs G.S., Jauhal J.J.S., et al.* Sequence and structural analysis of BTB domain proteins // *Genome Biol.* 2005. V. 6. № 10. P. R82.
12. *Savitskaya E., Melnikova L., Kostyuchenko M., et al.* Study of long-distance functional interactions between Su(Hw) insulators that can regulate enhancer-promoter communication in Drosophila melanogaster // *Mol Cell Biol.* 2006. V. 26. № 3. P. 754–761.
13. *Duncan I.W.* Transvection effects in Drosophila // *Annu Rev Genet.* 2002. V. 36. P. 521–556.
14. *Kravchenko E., Savitskaya E., Kravchuk O., et al.* Pairing between gypsy insulators facilitates the enhancer action in trans throughout the Drosophila genome // *Mol Cell Biol.* 2005. V. 25. № 21. P. 9283–9291.
15. *Geyer P.K., Corces V.G.* Separate regulatory elements are responsible for the complex pattern of tissue-specific and developmental transcription of the yellow locus in Drosophila melanogaster // *Genes Dev.* 1987. V. 1. № 9. P. 996–1004.
16. *Qian S., Varjavand B., Pirrotta V.* Molecular analysis of the zeste-white interaction reveals a promoter-proximal element essential for distant enhancer-promoter communication // *Genetics.* 1992. V. 131. № 1. P. 79–90.
17. *Geyer P.K., Spana C., Corces V.G.* On the molecular mechanism of gypsy-induced mutations at the yellow locus of Drosophila melanogaster // *EMBO J.* 1986. V. 5. № 10. P. 2657–2662.
18. *Scott K.C., Taubman A.D., Geyer P.K.* Enhancer blocking by the Drosophila gypsy insulator depends upon insulator anatomy and enhancer strength // *Genetics.* 1999. V. 153. № 2. P. 787–798.

19. *Bischof J., Maeda R.K., Hediger M., et al.* An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007. V. 104. № 9. P. 3312–3317.
20. *Baxley R.M., Soshnev A.A., Koryakov D.E., et al.* The role of the Suppressor of Hairless insulator protein in *Drosophila* oogenesis // *Dev Biol*. 2011. V. 356. № 2. P. 398–410.

IMPACT OF INTERACTIONS BETWEEN SU(HW)-DEPENDENT INSULATORS ON THE TRANSVECTION EFFECT IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

**L. S. Melnikova^{a, #}, V. V. Molodina^a,
Academician of the RAS P. G. Georgiev^a, A. K. Golovnin^a**

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

[#]*e-mail: lsm73@mail.ru*

Transvection is a phenomenon of interallelic communication in which enhancers can activate a specific promoter located on a homologous chromosome. Insulators play a significant role in ensuring functional interactions between enhancers and promoters. In the presented work, we created the model where two or three copies of the insulator are located next to enhancers and promoters localized on homologous chromosomes. Using the Su(Hw) insulator as model, we showed that the functional interaction between a pair of insulators promotes enhancer-promoter trans interactions. The interaction between the three insulators, on the contrary, can lead to the formation of chromatin loops that sterically hinder the full enhancer-promoter interaction. The results of the work suggest the participation of insulators in the regulation of homologous chromosome pairing and in communication between distant genomic loci.

Keywords: homologous chromosome pairing, enhancer-promoter interactions, insulator, Su(Hw), transcription regulation

УДК 616.1:577.1

АНАЛИЗ ЕСТЕСТВЕННЫХ АНТИТЕЛ ПРИ РАЗВИТИИ ФАНТОМНОГО БОЛЕВОГО СИНДРОМА

© 2024 г. М. А. Мягкова¹, С. Н. Петроченко¹*, З. В. Боброва¹, Е. А. Орлова¹

Представлено академиком РАН С.О. Бачуриным

Поступила 01.03.2024 г.

После доработки 17.03.2024 г.

Принято к публикации 20.03.2024 г.

Проведено определение естественных антител (е-Ат) к регуляторам основных систем биохимического гомеостаза: β -эндорфин, серотонин, дофамин, гистамин, орфанин, ангиотензин, ГАМК, глутамат, брадикинин, вазопрессин, тромбин, α -2-макроглобулин у лиц с фантомным болевым синдромом (ФБС), полученным при ампутации после ранения. Установлено, что каждый пациент обладает индивидуальным иммунопрофилем, но для всех достоверно увеличение уровня антител к серотонину, гистамину и ангиотензину, отражающих хронизацию болевого синдрома, и не зависящее от самооценки степени выраженности ФБС. Определение роли регуляторов биохимического гомеостаза в развитии фантомных болей показало, что при высокой, умеренной и слабой степени выраженности ФБС наиболее активно функционируют системы биогенных аминов и ангиотензинэргическая. Снижение интенсивности ФБС нормализует отклонения всех иммунологических показателей. Уровень е-Ат для болевой (β -эндорфин) и противоболевой (орфанин) систем значимы только при низком ФБС. Мониторинг индивидуального профиля е-Ат к эндогенным регуляторам позволяет получить объективную картину болевого статуса организма пациента.

Ключевые слова: естественные антитела к эндогенным регуляторам, иммуноферментный анализ, фантомная боль, оценка болевого синдрома, визуально-аналоговая шкала

DOI: 10.31857/S2686738924040118

ВВЕДЕНИЕ

Синдром фантома с болью имеет хроническое продолжительное течение, постепенно регрессирует со временем. Фантомная боль трудно поддается терапии, полное излечение наблюдается лишь у 15% больных [1, 2]. Актуальность настоящей проблемы обусловлена ростом числа пострадавших в военных конфликтах, при стихийных бедствиях и промышленных катастрофах, а также высоким удельным весом окклюзионных поражений сосудов нижних конечностей в структуре заболеваемости [3]. Понимание механизмов развития фантомного болевого синдрома (ФБС) постоянно трансформируется. Есть два основных предположения, откуда берется боль в отсутствующей конечности. Первое

связано с развитием невромы. Более сложная ситуация — это запоминание болевого синдрома на уровне спинного и головного мозга, где обрабатывается болевая информация [4, 5]. Сложности лечения обуславливают необходимость создания новых способов объективной диагностики и профилактики фантомов. В настоящее время существующие методы оценки болевых ощущений подразделяют на “субъективные”, “субъективно-объективные” и “объективные”. К первым относятся различные опросники, ко вторым алгометрия и третьи — это электрофизиологические методы, “визуализация” боли с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ), биохимические методы [6]. ФБС является следствием нарушений механизмов поддержания гомеостаза организма, который на молекулярном уровне характеризуется состоянием системы эндогенных биорегуляторов (ЭБ), обеспечивающих биохимическое равновесие [7]. Данный процесс сопровождается нейроиммунным взаимодействием, основанным на связи механизмов регуляции болевой чувствительности

¹Институт физиологически активных веществ
Федерального исследовательского центра проблем
химической физики и медицинской химии Российской
академии наук, г. Черноголовка, Московская обл., Россия

*e-mail: dianark@mail.ru

и работой иммунокомпетентных клеток организма [8, 9]. В последнее десятилетие накоплен значительный фактический материал, который убедительно свидетельствует о существенной роли иммунологических механизмов в развитии болевых синдромов [10]. Изменение иммунологических показателей, специфических естественных антител к ряду эндогенных биорегуляторов (ЭБ), происходит при дорсалгиях различного генеза [11]. На сегодняшний день разработаны аналитические методы измерения уровня естественных антител (е-Ат), характеризующих состояние системы эндогенных биорегуляторов в норме и при различных патологиях [7]. Совокупность е-Ат отражает и индивидуально регулирует по принципу специфического взаимодействия и обратной связи состав эндогенных регуляторов в организме. Содержание е-Ат находится в прямой зависимости от уровня эндогенных биохимических регуляторов [7, 10]. Установлено, что свойства указанных иммунологических маркеров претерпевают изменения в качественном и количественном отношении, на самых ранних стадиях возникновения заболевания [10, 12]. Определение факторов нейрогуморальной регуляции, участвующих в передаче болевого сигнала, является перспективной основой для разработки диагностического метода объективизации боли.

Цель работы заключалась в определении уровня естественных антител к эндогенным регуляторам основных биохимических систем, включая β -эндорфин, серотонин, дофамин, гистамин, орфанин, ангиотензин, ГАМК, глутамат, брадикинин, вазопрессин, тромбин, α -2-макроглобулин в сыворотке крови лиц, страдающих фантомным болевым синдромом, полученным при хирургической ампутации после минно-взрывного ранения. Установление прогностической роли данных показателей в объективизации болевого статуса пациента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на базе клинико-диагностической лаборатории “ДИАНАРК” г. Москвы (Лицензия №ЛО41-01137-77/00369646 от 09.12.2014 г.). Материалы для исследования предоставлены госпиталем ФГБУ “НМИЦ ВМТ им. А.А. Вишневого” МО России. Проведено обследование 9 пациентов мужчин военнослужащих в возрасте от 31 года до 37 лет (средний возраст $34,0 \pm 0,8$ года), проходивших лечение после полученного в результате боевых действий минно-взрывного ранения (6–8 месяцев назад). В последующем проведенная хирургическая операция вызвала у пациентов развитие фантомных болей различной степени тяжести. В данный момент пациенты находятся на стадии подготовки к протезированию. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании

и обработку персональных данных. Оценку степени болевого синдрома проводили по визуально-аналоговой шкале ВАШ, с учетом субъективных данных обследованных пациентов [6]. На отрезке прямой 10 делениями больные отмечали интенсивность боли. Ноль соответствовал полному отсутствию боли, слабая боль – 0–2 балла, умеренная боль – 2,1–4 балла, сильная боль – 4,1–6 баллов, сильнейшая боль 6,1–8 баллов, невыносимая боль – 8,1–10 баллов.

Забор образцов крови из вены для анализа осуществляли у всех пациентов при поступлении в стационар на госпитализацию. Далее образцы сыворотки крови хранили при температуре минус 20°C до момента тестирования, которое проводили одновременно для всех анализируемых образцов. Для сравнения показателей использовали группу контроля из 10 здоровых мужчин одинакового возраста с обследуемыми участниками эксперимента. При проведении иммунохимических исследований применяли твердофазный метод ИФА определения антител класса IgG к β -эндорфину, серотонину, дофамину, гистамину, орфанину, ангиотензину, ГАМК, глутамату, брадикинину, вазопрессину, тромбину, α -2-макроглобулину в сыворотке крови человека, разработанный ранее [7]. Для этого использовали “Набор реагентов для иммуноферментного определения антител к эндогенным биорегуляторам в сыворотке крови “АДИМУСТАТ®” (РУ № РЗН 2022/19268; Производство “ДИАНАРК”). Результаты измерения в ИФА оптической плотности (ОП) выражают в условных единицах (KOD_{450}) и рассчитывают по формуле $KOD_{450} = \frac{ОП \text{ анализируемого образца}}{ОП \text{ контрольного образца}}$ — ОП контрольного образца/ОП контрольного образца. Для контрольных образцов расчет проводили по формуле $KOD_{450} = \frac{ОП \text{ положительного контрольного образца}}{ОП \text{ отрицательного контрольного образца}}$ — ОП отрицательного контрольного образца/ОП отрицательного контрольного образца. Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Statistica 6.0. Результаты исследования оценивали с использованием средней арифметической величины (M), стандартного отклонения (sd). Для установления различий изменения иммунологических показателей е-Ат к исследуемым антигенам для каждого пациента проводили сравнение значений ОП контрольной группы “норма”, для которой соответствовал интервал, равный $M_{ср} \pm \sigma$. Повышенному содержанию е-Ат соответствовал интервал показателей ОП от $(M_{ср} + 2\sigma)$ до $(M_{ср} + 3\sigma)$, пониженному — показатель ОП ниже $(M_{ср} - \sigma)$. При сравнении показателей интенсивности выраженной боли по шкале ВАШ и уровня е-Ат к анализируемым эндогенным регуляторам проведен расчет значений иммунологических показателей в процентах. При этом за 100% процентов принималось среднее значение оптической плотности для анализируемого антигена в группе здоровых лиц.

Далее рассчитана в процентах разница отклонения значений оптической плотности от контрольных величин у каждого обследованного пациента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено определение естественных антител, специфически взаимодействующих с биохимическими регуляторами гомеостаза, характеризующих функциональное состояние основных систем, включая торможение и возбуждения, опиатной и антиопиатной, биогенных аминов, ренин-ангиотензиновой, белкам гемостаза в сыворотке крови военнослужащих, находящихся на лечении после полученного минно-взрывного ранения, приведшего к ампутации конечности. Выбранные для анализа эндогенные молекулы являются универсальными маркерами психофизиологического здоровья

человека, а отклонение их уровня от нормы может свидетельствовать о текущем состоянии и рисках осложнений.

Установлено, что изменение уровней специфических антител к β -эндорфину, серотонину, дофамину, гистамину, орфанину, ангиотензину, ГАМК, глутамату, брадикинину, вазопрессину, тромбину, α -2-макроглобулину, является индивидуальным, и каждый пациент обладает характерным иммунопрофилем (рис. 1).

Результаты иммуноферментного измерения уровня е-Ат к эндогенным медиаторам, участвующих в регуляции передачи болевого импульса, представлены в таблице 1.

В механизмах развития боли участвуют медиаторные системы моноаминовой природы [10, 13]. Так, для всех обследованных лиц отмечено достоверное увеличение уровня е-Ат к серотонину и гистамину. Однако показатель е-Ат к дофамину

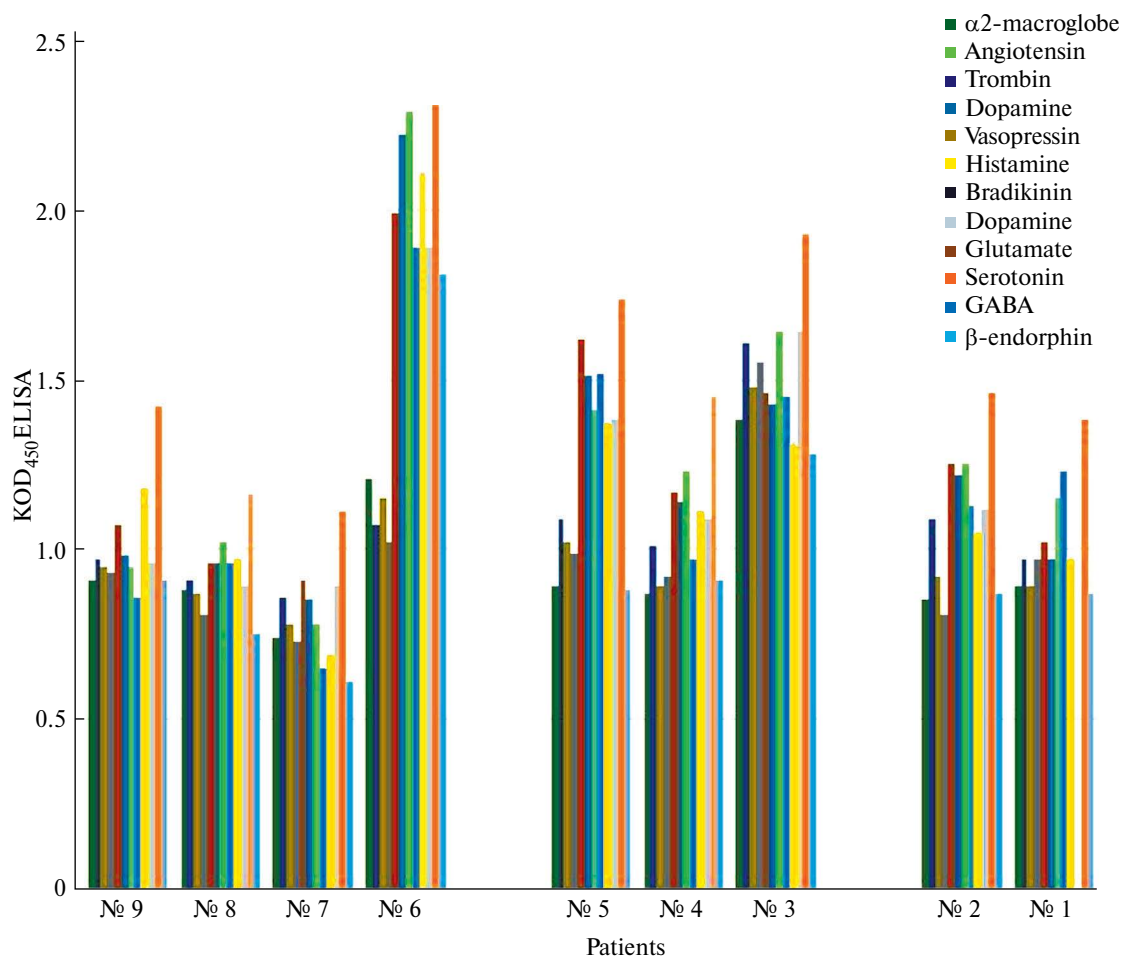


Рис. 1. Результаты сравнения уровня е-Ат к эндогенным регуляторам, для группы обследованных пациентов №№ 1–9. По оси абсцисс: значение KOD_{450} в ИФА для е-Ат к анализируемым эндогенным регуляторам каждого пациента. Ниже приведен перечень анализируемых эндогенных регуляторов, выделенных цветом. Результат каждого обследованного пациента представлен в соответствии с выбранным цветом для антигена, как значение KOD_{450} в ИФА. По оси ординат: номера обследуемых пациентов.

Таблица 1. Результаты ИФА определения уровня е-Ат в группе обследованных пациентов

Пациент № п/п	Показатели уровня естественных антител (КОД450 ИФА) в сыворотке крови обследуемых пациентов, выраженные в условных единицах											
	β-эндорфин	Серотонин	Дофамин	Гистамин	Орфанин	Ангиотензин II	ГАМК	Глутамат	Брадикинин	Вазопрессин	Тромбин	α2-макротглоб
№1	0,87	1,38*	0,98*	0,97*	1,23*	1,15*	0,97	1,02	0,97	0,89	0,97	0,89
№2	0,87	1,46*	1,12*	1,05*	1,13*	1,25*	1,22*	1,25*	0,81	0,92	1,09*	0,85
№3	1,28*	1,93*	1,64*	1,31*	1,45*	1,64*	1,43*	1,46*	1,55*	1,48*	1,61*	1,38*
№4	0,91*	1,45*	1,09*	1,11*	0,97	1,23*	1,14*	1,17*	0,92	0,89	1,01*	0,87
№5	0,88	1,74*	1,38*	1,37*	1,52*	1,41*	1,51*	1,62*	0,99	1,02*	1,09*	0,89
№6	1,81*	2,31*	1,89*	2,11*	1,89*	2,29*	2,22*	1,99*	1,02*	1,15*	1,07*	1,21*
№7	0,61	1,11*	0,89	0,69	0,65	0,78	0,85	0,91	0,73	0,78	0,86	0,74
№8	0,75	1,16*	0,89	0,97*	0,96	1,02*	0,96	0,96	0,81	0,87	0,91	0,88
№9	0,91*	1,42*	0,96	1,18*	0,86	0,95*	0,98	1,07	0,93	0,95	0,97	0,91
Группа контроля КОД450 ИФА (М ср ± σ)	0,59 ± 0,17	0,77 ± 0,18	0,79 ± 0,15	0,62 ± 0,15	0,84 ± 0,14	0,62 ± 0,18	0,91 ± 0,15	0,92 ± 0,16	0,71 ± 0,15	0,72 ± 0,17	0,81 ± 0,13	0,69 ± 0,18

Примечание: * – повышенное содержание е-Ат соответствует интервалу показателей от (Мср+2σ) до (М ср + 3σ)

увеличен только для пациентов №№1–6, а для остальных лиц №№7–9 изменения не достоверны.

Передача болевого сигнала связана с ноцицептивной (НЦС) и антиноцицептивной (АНЦС) системами, представителями которых являются пептиды орфанин и β-эндорфин [8]. У пациентов обследованной группы отмечено достоверное повышение уровня е-Ат к орфанину для лиц №№1–3 и №№5 и 6, а для показателя е-Ат к β-эндорфину достоверное увеличение наблюдали лишь у пациентов №№ 3и 4; №№ 6 и 9.

Для половины пациентов обследуемой группы №№1–5 обнаружено увеличение значений показателей е-Ат тормозных и возбуждающих медиаторов (ГАМК и Глутамат), которые влияют на проводимость болевого импульса и обеспечивают энергетический ресурс организма. Учитывая тесную связь биохимических превращений указанных веществ при метаболизме, положительным является факт сбалансированного одновременного изменения этих показателей.

Анализ показателей ренин-ангиотензиновой системы позволил установить наиболее значимые изменения для уровня е-Ат к ангиотензину, который модулирует восприятия боли, за счет изменения стенки сосудов. В случае брадикинина, являющегося одним из медиаторов боли, воспаления, достоверное увеличение е-Ат наблюдали для пациентов №№3 и 6. Аналогичные результаты получены для показателей е-Ат к вазопрессину, которые лишь дополняет пациент №5. Для белков регуляторов гемостаза отмечено повышение уровня е-Ат в случае тромбина у пациентов №№2–6, а в случае α2-макроглобулина №№ 3 и 6.

Таким образом, результаты ИФА определения е-Ат к: дофамину, серотонину, гистамину, β-эндорфину, ГАМК, глутамату, ангиотензину II, брадикинину, орфанину являются информативными иммунологическими показателями, характеризующими “болевого статус” пациентов.

В группе обследованных пациентов провели сравнительный анализ показателей интенсивности выраженности боли и значений уровня е-Ат к перечисленным выше эндогенным регуляторам.

Иммунологические показатели для исследуемых е-Ат рассчитаны в процентах. Это разница отклонения значений оптической плотности от контрольных величин у каждого обследованного пациента. Показатели шкалы ВАШ выражены в балах.

Согласно шкале самооценки для обследованных лиц зарегистрирован различный уровень чувствительности к фантомной боли. У пациента №1 отмечена сильнейшая боль, далее пациенты № №4, 5, 7 характеризовались показателем умеренной боли, а для пациента №8 отмечена сильная боль, оставшиеся пациенты №№2, 3, 6 и 9 имели слабую боль или ее отсутствие.

Анализ представленных в таблице 2 данных показал, что для пациента №1 с высоким уровнем ФБС наиболее значимыми являются показатели для е-Ат к серотонину и ангиотензину. При снижении проявления ФБС (пациент №8) отмечается не большие по сравнению с нормой колебания по всем исследуемым иммунологическим показателям. Для пациентов №№ 4,5 и 7, имеющих умеренный ФБС, установлено, что показатели е-Ат могут быть либо одновременно повышены для моноаминовой (серотонин, гистамин, дофамин) и ренин-ангиотензиновой (ангиотезин) системы, либо, в случае пациента №7, показатели близки к норме. При слабом проявлении ФБС (пациенты №№ 2,3,6 и 9) наиболее значимым является уровень е-Ат к гистамину, серотонину и ангиотензину. Изменение показателей е-Ат к орфанину и β -эндорфину, участвующих в регуляции НЦС и АНЦС систем, обнаружено для пациентов №3 и 6, с низким уровнем ФБС.

По современным научным представлениям антитела к эндогенным регуляторам боли рассматриваются как фактор обратной связи взаимодействия ЦНС и иммунной системы [4, 8]. С помощью специфичных антител происходит иммуномодуляция активности системы болевой проводимости [10]. Известно, что хроническую боль сопровождают стресс и эмоциональное напряжение. Они вызывают повышение секреции биогенных аминов в крови, которые играют ведущую роль в патогенезе болезненных и стрессовых состояний [12, 13]. Согласно результатам проведенного исследования содержание специфических антител к серотонину, гистамину повышено у всех обследованных лиц, а для дофамина

достоверное изменение выявлено у пяти пациентов, для остальных отмечена тенденция к повышению уровня е-Ат. По-видимому, такое распределение связано с индивидуальной психоэмоциональной реакцией на уровень боли и эффективность его купирования.

Анализируя полученные в работе результаты, можно отметить, что у половины обследованных пациентов в сыворотке крови происходит в различной степени повышение уровня антител к β -эндорфину, орфанину, но процесс не сопровождается одновременным изменением двух показателей. В физиологических условиях боль проводящая система сбалансирована комплексом противоболевой системы. Различия в изменении иммунологических показателей для β -эндорфина, орфанина в обследованной группе пациентов свидетельствует о дисбалансе в системах.

Значительная роль в процессе ФБС принадлежит перевозбуждению центральных нервных структур. Для половины пациентов обследуемой группы №№1–5 обнаружено увеличение показателей е-Ат тормозных и возбуждающих медиаторов (ГАМК и Глутамат), которые участвуют в проводимости болевого сигнала [9, 11]. Важно отметить положительный факт, что оба показателя имеют однонаправленное изменение, что свидетельствует о сбалансированности работы систем торможения и возбуждения.

Характерным показателем для всех пациентов обследованной группы является достоверное увеличение уровня антител к ангиотензину. Изучение связи болевой чувствительности у здоровых людей с наличием редких вариантов генов показало, что в значительной мере они принадлежат

Таблица 2. Сравнение показателей шкалы ВАШ с результатами ИФА в обследованной группе пациентов

Пациент № п/п	Показатель ВАШ (бал)	Иммунологический показатель (отклонения в %)								
		Дофамин	Серотонин	Гистамин	β -эндорфин	ГАМК	Глутамат	Ангиотензин II	Брадикинин	Орфанин
№1	6,1–8	13,9↑	55,1↑	40,6↑	29,8↑	N	4,1↑	61,9↑	25,9↑	32,3↑
№2	0–2	30,2↑	64,0↑	52,2↑	29,8↑	23,2↑	27,5↑	76,1↑	5,2↑	21,5↑
№3	0–2	90,7↑	116,8↑	89,9↑	91,0↑	44,4↑	48,9↑	130,9↑	101,3↑	55,9↑
№4	2,1–4	26,7↑	62,9↑	60,9↑	35,8↑	15,1↑	19,4↑	73,2↑	19,5↑	4,31↑
№5	2,1–4	60,5↑	95,5↑	98,5↑	31,3↑	52,5↑	65,3↑	98,6↑	28,6↑	63,4↑
№6	0–2	119,8↑	159,5↑	205,8↑	170,1↑	124,2↑	103,1↑	222,5↑	32,5↑	103,2↑
№7	2,1–4	3,5↑	24,7↑	N	N	N	N	9,1↑	N	14,6↓
№8	4,1–6	4,5↓	6,0↓	10,3↑	8,0↓	7,3↓	8,3↓	4,9↓	11,1↓	7,3↓
№9	0–2	11,4↑	59,5↑	71,0↑	35,8↑	N	9,2↑	33,8↑	20,8↑	N

Примечание. ↑ – увеличение показателя при сравнении со значениями контроля. ↓ – снижение показателя при сравнении со значениями контроля.

ангиотензинэргической системе [14]. Пептиды брадикинин и вазопрессин являются биологически активными молекулами, участвующими в проводимости болевой пульсации при воспалении. Однако к указанным выше регуляторам обнаружено увеличение уровня е-Ат лишь у незначительного числа обследованных лиц. Аналогичные данные получены и для белков регуляторов гемостаза.

Проводя оценку роли регуляторов той или иной системы биохимического гомеостаза в развитии фантомных болей можно предположить, что при высокой, умеренной и слабой степени выраженности ФБС активированы системы биогенных аминов и ангиотензинэргическая. По мере снижения интенсивности ФБС отмечена нормализация отклонения иммунологических показателей для всех исследуемых регуляторов. Изменения показателей НЦС и АНЦС систем наиболее значимо только при низком ФБС. Исследования последних лет показывают, что при развитии боли происходит множество реакций, неосознаваемых человеком, которые в итоге влияют как на интенсивность боли, так и на процесс ее хронизации. Выраженность боли, оцененная по различным шкалам, может не иметь связи со степенью дисбаланса этих систем, с нейрофизиологическими и другими характеристиками проявления боли.

Таким образом, в ходе исследования выявлены особенности распределения иммунологических показателей е-Ат к регуляторам основных систем биохимического гомеостаза. Установлено, что каждый обследуемый пациент обладает индивидуальным иммунопрофилем, но для всех участников эксперимента характерно увеличение уровня е-Ат к серотонину, гистамину и ангиотензину. Определение указанных показателей отражает хронизацию болевого синдрома, но не зависит от самооценки степени выраженности фантомной боли. Мониторинг индивидуального профиля е-Ат к эндогенным регуляторам позволяет получить объективную картину болевого статуса организма пациента и выбрать эффективную, персональную лечебную программу.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Представленные исследования выполнены в соответствии с принципами биомедицинской этики,

сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующих обновлениях, а также одобрены локальным биоэтическим комитетом “Института физиологически активных веществ РАН” (Черноголовка, Московская область) протокол № 2 от 14 декабря 2023 года.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в соответствии с исследованием, согласно Госрегистрации № 01200952666.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Осипова Н. А., Собченко Л. А.* Постампутационный фантомный болевой синдром: медицинские и социальные проблемы // *Анестезиология и реаниматология*. 2011. № 6. С. 41–43.
2. *Hsiao A.F., York R., Hsiao I., Hansen E., Hays R.D., Ives J., Coulter I.D.* A randomized controlled study to evaluate the efficacy of noninvasive limb cover for chronic phantom limb pain among veteran amputees. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 2012. 93(4):617–222.
3. *Jackson M. A.* Pain after amputation // *British Journal of Anaesthesia*. 2012. P. 1743–1824. doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkh007
4. *Gabriel R., Jianren M.* Immature spinal cord neurons are dynamic regulators of adult nociceptive sensitivity. *J. Cell. Mol. Med.* // 2015. 19, 2352–2364.
5. *Moura V.L., Faurot K.R., Gaylord S.A., Mann J.D., Sill M., Lynch C., Lee M.Y.* Mind-body interventions for treatment of phantom limb pain in persons with amputation. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 2012; 91(8):701–14.
6. *Attal N., Bouhassira D., Baron R.* Diagnosis and assessment of neuropathic pain through questionnaires. *Lancet Neurol.* 2018; 17(5):456–466.
7. *Мягова М.А., Петроченко С.Н., Морозова В.С.* Определение антител к эндогенным биорегуляторам для диагностики функционального состояния организма // *Известия АН. Серия химическая*, 2018. № 4. С. 762–767.
8. *Verma V., Sheikh Z., Ahmed A.S.* Nociception and role of immune system in pain. *ActaNeurolBelg.* 2015; 115(3):213–220.
9. *Решетняк В.К., Кукушкин М.Л.* Центральные и периферические механизмы физиологической и патологической боли. *Клиническая патофизиология*. 2015; 1: 1–17.
10. *Левашова А.И., Морозова В.С., Петроченко С.Н., Мягова М.А., Мосейкин И.А.* //Сравнительный анализ иммунохимических и клинических показателей при дорсалгиях корешкового и рефлекторного генеза // *Журн. неврологии и психиатрии им. Корсакова*. 2017; 3: 4–10.

11. Левашова А.И., Мяжкова М.А. Анализ иммунохимических показателей при вертеброгенном болевом синдроме // *Biomedical Chemistry: Research and Methods* 2018, 1(3), 1–5.
12. Игонькина С.И., Ветрилэ Л.А., Кукушкин М.Л. Влияние антител к норадреналину на развитие невропатической боли. Бюлл. экспер. биологии и медицины. 2016; 162(12): 678–681.
13. Obara I., Telezhkin V., Alrashdi I., Chazot P. Histamine, histamine receptors, and neuropathic pain relief // *Br J Pharmacol.* 2019. V. 177. P. 580–599.
14. Гордеев А.В., Галушко Е.А., Савушкина Н.М. Роль ангиотензинов в патогенезе воспалительных заболеваний суставов // *Терапевтический архив.* 2021; 93 (5): 635–639.

ANALYSIS OF NATURAL ANTIBODIES DURING THE DEVELOPMENT OF PHANTOM PAIN SYNDROME

M. A. Myagkova^a, S. N. Petrochenko^{a, #}, Z. V. Bobrova^a, E. A. Orlova^a

Presented by Academician of the RAS S.O. Bachyurin

^a*Institute of Physiologically Active Substances Federal Research Center
for Problems of Chemical Physics and Medical Chemistry Russian Academy of Sciences,
Chernogolovka, Moscow region, Russian Federation*

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

We determined natural antibodies (e-Abs) to the regulators of the main systems of biochemical homeostasis: β -endorphin, serotonin, dopamine, histamine, orphanin, angiotensin, GABA, glutamate, bradykinin, vasopressin, thrombin, α -2-macroglobulin in individuals with phantom pain syndrome (FBS), resulting from amputation after injury. It has been established that each patient has an individual immunoprofile, but for all of them there is a significant increase in the level of antibodies to serotonin, histamine and angiotensin, which reflect the chronicity of the pain syndrome and do not depend on the self-assessment of the severity of FBS. Determining the role of regulators of biochemical homeostasis in the development of phantom pain showed that with high, moderate and weak severity of FBS, the biogenic amine and angiotensinergic systems are activated. A decrease in FBS intensity normalizes deviations in all immunological parameters. The level of e-Abs for the pain (β -endorphin) and analgesic (orphanin) systems are significant only at low FBS. Monitoring the individual profile of e-Abs to endogenous regulators allows us to obtain an objective picture of the pain status of the patient's body.

Keywords: natural antibodies to endogenous regulators, enzyme-linked immunosorbent assay, phantom pain, pain syndrome assessment, visual analogue scale

УДК 577.2

ГОМЕОТИЧЕСКИЕ ГЕНЫ *DUX4* ОБРАЗУЮТ ДИНАМИЧНЫЕ КОНТАКТЫ С ЯДРЫШКАМИ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. Е. С. Клушевская¹, И. Р. Алембеков¹, Ю. В. Кравацкий¹, Н. А. Чуриков^{1, *}

Представлено академиком РАН Г.П. Георгиевым

Поступило 25.03.2024 г.

После доработки 15.04.2024 г.

Принято к публикации 16.04.2024 г.

Ядрышки образуют меж-хромосомные контакты с генами, контролирующими дифференцировку и канцерогенез. Гены *DUX4* кодируют фактор транскрипции, содержащий двойной гомеодомен. Ранее с помощью метода 4C (Circular Chromosome Conformation Capture) на популяции клеток было обнаружено, что гены *DUX4* образуют частые контакты с генами рРНК. Также было найдено, что после теплового шока контакты почти полностью пропадают. Метод 4C, как и другие ligation-mediated подходы, способен заметить только близкие контакты между петлями хроматина в ядрах. Для того чтобы независимо подтвердить наличие и выявить частоту контактов генов *DUX4* с кластерами генов рРНК в отдельных клетках и выяснить, как далеко при тепловом стрессе уходят эти гены от ядрышек, мы использовали метод FISH. В результате впервые на отдельных клетках линии НЕК293Т было обнаружено, что гены *DUX4* образуют стабильные контакты с ядрышками во всех исследованных клетках, а при тепловом шоке гены *DUX4* обратимо удаляются от ядрышек на 1–3 микрометра. Следовательно, меж-хромосомные контакты, образуемые ядрышками, прочны, динамичны и обратимы. Мы предполагаем, что их стабильность важна для поддержания состояния дифференцировки.

Ключевые слова: гены рРНК, гены *DUX*, меж-хромосомные контакты, тепловой шок, FISH

DOI: 10.31857/S2686738924040121

К настоящему времени накапливаются данные о важной роли ядрышек в процессах, не связанных с синтезом рРНК и биогенезом рибосом. Ядрышки вовлечены в глобальные механизмы регуляции экспрессии генов, в репарацию разрывов в ДНК, в клеточные ответы на стрессы и в другие процессы [1–5]. Ядрышки образуют меж-хромосомные контакты с генами, контролирующими дифференцировку и канцерогенез [6,7]. Предполагается, что вокруг ядрышек формируются микро-конденсаты, содержащие репрессоры или активаторы транскрипции, и что гены из разных областей генома, попадая в такие микрокапли, совместно активируются либо репрессируются [2,3,8].

Гены *DUX4* кодируют фактор транскрипции, содержащий двойной гомеодомен. Они образуют частые контакты с генами рРНК [9]. Это было обнаружено с помощью метода 4C (Circular Chromosome Conformation Capture) на популяции

клеток. С помощью данного метода было найдено, что после теплового шока контакты почти полностью пропадают [9]. Метод 4C, как и другие ligation-mediated подходы, способен заметить только близкие контакты между петлями хроматина в ядрах. Для того чтобы независимо подтвердить наличие и выявить частоту контактов генов *DUX4* с кластерами генов рРНК в отдельных клетках и выяснить, как далеко при тепловом стрессе уходят эти гены от ядрышек, мы использовали метод FISH (Fluorescent In Situ Hybridization). В результате впервые на отдельных клетках линии НЕК293Т было обнаружено, что гены *DUX4* образуют стабильные контакты с ядрышками во всех исследованных клетках, а при тепловом шоке гены *DUX4* удаляются от ядрышек на 1–3 микрометра. Такое удаление соответствует примерно 150 kb ДНК, упакованной в 30 nm фибрилле хроматина [8,10], что критично для метода 4C. Следовательно, меж-хромосомные контакты, образуемые ядрышками, прочны, динамичны и обратимы. Мы предполагаем, что их стабильность важна для поддержания состояния дифференцировки.

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской Академии наук, Москва, Россия

*e-mail: tchurikov@eimb.ru

Для экспериментов FISH использовали Alexa-3-меченый клонированный фрагмент гена рРНК [11]. Фрагмент ДНК длиной около 5.5 kb из chr4 человека, расположенный на расстоянии около 7 kb от кластера генов *DUX* в субтеломерном районе данной хромосомы (рис. 1) наработали с помощью long PCR и метили Alexa-5. Эксперименты проводили на клетках HEK293T. Тепловой шок проводили в течение 30 минут при 43°C, с последующим восстановлением клеток в течение 2,5 часов в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Гибридизацию проводили, как описано ранее [12]. Препараты анализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5. Анализ изображений проводили с помощью программы ImageJ (National Institutes of Health, США) [https://imagej.net/software/fiji/]. Степень ко-локализации определяли с помощью инструмента оценки ко-локализации сигналов флуоресценции JACoP, (Just Another Co-localization Plugin) [13]. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы STATISTICA v10 (StatSoft, США). Сравнение 2 выборок осуществляли с помощью дисперсионного анализа. Для оценки значимости различий двух групп использовали метод χ^2 Пирсона.

На рис. 2 представлены результаты FISH. Оказалось, что имеется около 10 фокусов гибридизации *DUX*, что было ожидаемым, т.к. амплифицированный фрагмент является повтором, связанным с генами *DUX*, и по данным BLAST – Genome (GRCh38.p14 reference assembly RS_2023_10) представлен в хромосомах 3, 4, 10, 12–15, 21, 22, и в нескольких еще нелокализованных областях генома человека. Известно, что в хромосомах 4 и 10 в кластере генов *DUX* имеется от 8 до 100 копий [14, 15]. Видно, что имеются гены *DUX*, которые расположены вокруг ядрышка (рис. 2а). Кластеры генов рРНК в клетках HEK293T представлены в виде одного ядрышка. Профили сигналов *DUX* и *rDNA* позволили выявить, что в исходных клетках гены *DUX* расположены непосредственно по краям области ядрышка (рис. 2б). После теплового шока они немного – до 2.5 μ m – удаляются от ядрышка (рис. 2г).

Мы наблюдали контакты генов *DUX* с ядрышками во всех исследованных таким образом клетках. Меж-хромосомные контакты генов *DUX* с генами рРНК исходно были обнаружены с помощью метода 4C на популяции клеток [6, 9, 16]. В настоящей работе с помощью FISH на отдельных клетках выявлено, что эти контакты характерны для всех клеток. Кроме того, удалось выявить достоверные изменения характера контактов после теплового шока. Оказалось, что этот стресс вызывает диссоциацию контактов – небольшое удаление хроматиновых петель разных хромосом от ядрышек. Клетки после шести часов восстанавливают прежний характер контактов (не показано). Следовательно,

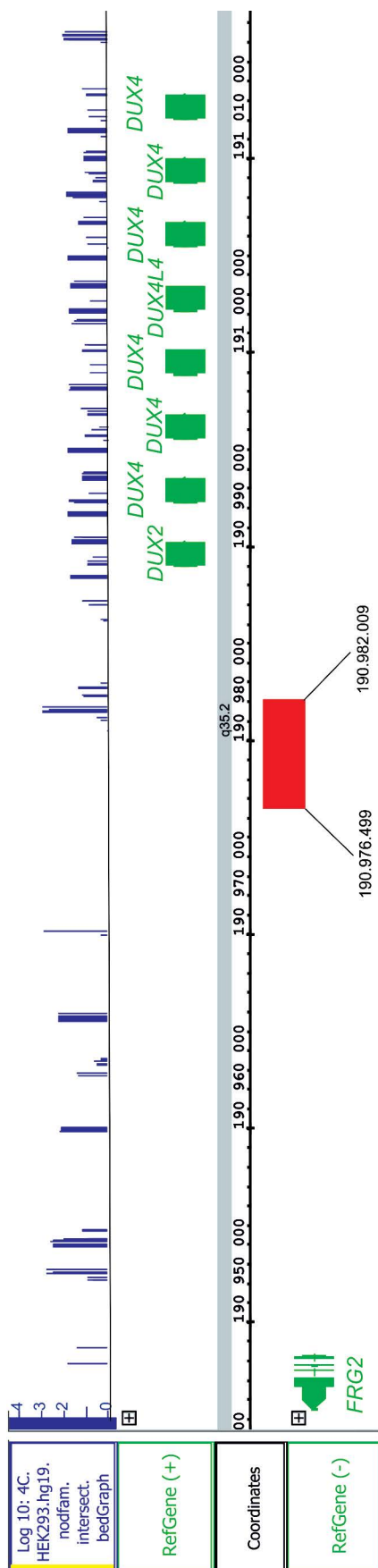


Рис. 1. Физическая карта субтеломерной области chr4 и места контактов генов рРНК, выявленные с помощью метода 4C в линии клеток HEK293T (координаты в геномном браузере IGB приведены для версии генома человека hg19). Синим показаны места контактов генов рРНК. Зеленым указаны гены *DUX*. Красный прямоугольник указывает область ДНК длиной 5511 bp, которая была наработана с помощью long PCR и использована для FISH.

диссоциация обратима и что-то еще удерживает удаленные на 2.5 μm петли хроматина из разных хромосом близко около ядрышек.

Использование программы ImageJ позволило оценить число близких контактов генов *DUX4* с ядрышками. Оказалось, что в среднем около двух таких контактов приходится на ядрышко в исходных клетках, тогда как после теплового шока в четыре раза меньше — один контакт на два ядрышка (рис. 3а). По данным 4С, наибольшее число контактов генов рРНК с генами

DUX4 приходится на субтеломерные районы хромосом 4 и 10. Поэтому мы считаем, что два наиболее стабильных контакта должны соответствовать данным районам. Это согласуется и с данными, представленными на рис. 2.

Интересные данные были получены при анализе доли фокусов гибридизации генов *DUX* по мере удаления от границ ядрышек в исходных клетках и в клетках после теплового шока. Доли генов *DUX* на расстоянии 1–3 мкм от ядрышек резко уменьшаются. При удалении более чем на 3 мкм доли

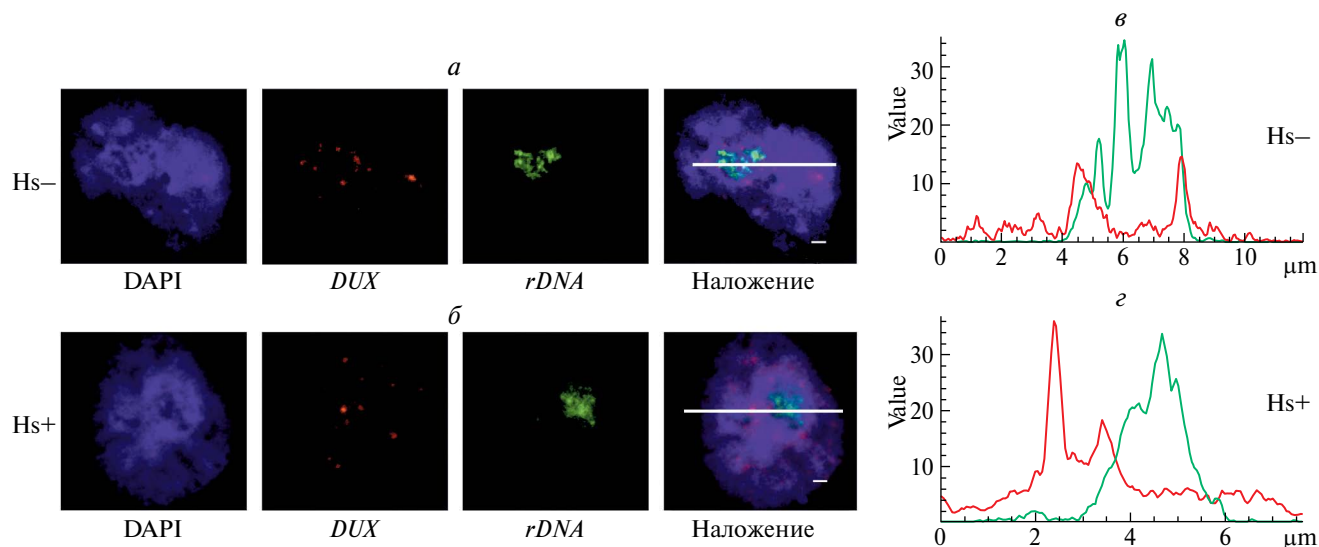


Рис. 2. Результаты FISH. *a* — эксперименты с исходными клетками. *б* — эксперименты с клетками после теплового шока. Белым показана ось при сканировании сигналов флуоресценции, проходящая через центр ядрышек. *в* — профиль сканирования ядра без теплового шока. *г* — профиль сканирования ядра после теплового шока. Сигнал *DUX* (Alexa-5) показан красным, а сигнал *rDNA* (Alexa-3) — зеленым. По горизонтали показаны расстояния в мкм.

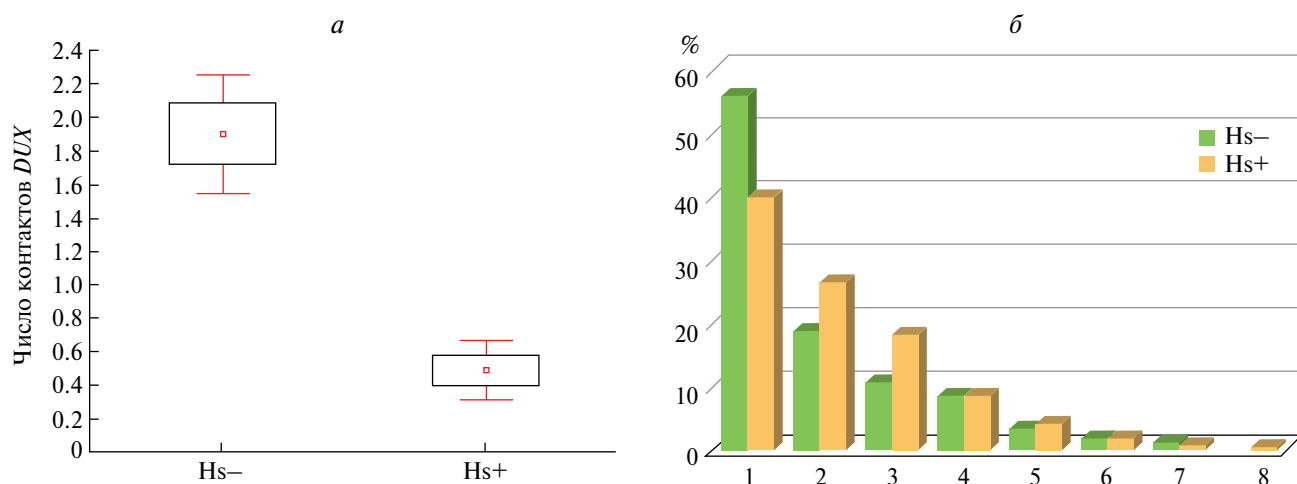


Рис. 3. Диаграммы, показывающие число фокусов гибридизации зонда *DUX*, приходящееся на одно ядро в исходных клетках и в клетках после теплового шока (*a*) и % фокусов гибридизации пробы *DUX* в ядрах по мере удаления от центра ядрышка (*б*). HS — эксперименты с исходными клетками. HS+ — эксперименты с клетками после теплового шока. Для анализа использовали по 100 клеток. *p*-value < 0.05.

генов *DUX* в экспериментах с тепловым шоком и без него уменьшаются, но уже мало отличаются друг от друга. Т.е. изменения в ядрышках при тепловом шоке не влияют на копии генов *DUX*, расположенные на расстоянии более 4 мкм. Это независимо подтверждает вывод о том, что межхромосомные контакты генов *DUX* с ядрышками довольно близки (см. рис. 2в) и их число резко уменьшается на удалении уже в 2 мкм от ядрышка (рис. 3б). Таким образом, при тепловом шоке удерживающее влияние ядрышек на петли хроматина на удалении более 4 мкм не распространяется.

Пока неизвестны механизмы образования межхромосомных контактов, в которые вовлечены гены, контролирующие дифференцировку и рак [6]. В разных типах клеток человека в местах таких контактов обнаружены метки неактивного хроматина H3K27me3 в генах, контролирующих морфогенез [17]. Эти метки характерны для эпигенетического сайленсинга. Известно, что гены *DUX* подвергаются сайленсингу в раннем развитии уже на стадии двух бластомеров [18].

Обнаружено, что местам частых контактов генов рРНК в многочисленных областях генома человека соответствуют протяженные (до 50 kb) области хроматина, содержащие метки активного хроматина H3K27ac [2, 6]. Такие области соответствуют супер-энхансерам [19]. Недавно было обнаружено, что области супер-энхансеров формируют микроконденсаты путем образования разделения жидких фаз в ядре (liquid-liquid phase separation) [20] и что большие группы генов, контролирующих дифференцировку и контактирующих с ядрышками, ко-экспрессируются в разных комбинациях [8]. Таким образом, имеющиеся к настоящему времени данные позволяют предполагать, что наборы факторов транскрипции в составе микроконденсатов, которые образуются вокруг ядрышка, обеспечивают ко-экспрессию больших групп генов, которые образуют межхромосомные контакты с кластерами генов рРНК. В настоящее время мы проверяем эти предположения экспериментально.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема №124032100001-4).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием человека и животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Savic N., Bär D., Leone S., Frommel S.C., Weber F.A., Vollenweider E., Ferrari E., Ziegler U., Kaech A., Shakhova O., Cinelli P., Santoro R. lncRNA maturation to initiate heterochromatin formation in the nucleolus is required for exit from pluripotency in ESCs // *Cell Stem Cell*. 2014. Vol. 15. № 6. P. 720–734.
2. Tchurikov N.A., Fedoseeva D.M., Sosin D.V., Snezhkina A.V., Melnikova N.V., Kudryavtseva A.V., Kravatsky Y.V., Kretova O.V. Hot spots of DNA double-strand breaks and genomic contacts of human rDNA units are involved in epigenetic regulation // *J. Mol. Cell Biol.* 2015. Vol. 7. № 4. P. 366–382.
3. Tchurikov N.A., Kravatsky Y.V. The Role of rDNA Clusters in Global Epigenetic Gene Regulation // *Front. Genet.* 2021. Vol. 12. P. 730633.
4. Kobayashi T. Ribosomal RNA gene repeats, their stability and cellular senescence // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 2014. Vol. 90. № 4. P. 119–129.
5. Feng S., Desotell A., Ross A., Jovanovic M., Manley J.L. A nucleolar long “non-coding” RNA encodes a novel protein that functions in response to stress // *PNAS*. 2023. Vol. 120. № 9. P. e2221109120.
6. Tchurikov N.A., Fedoseeva D.M., Klushevskaya E.S., Slovohtov I.Y., Chechetkin V.R., Kravatsky Y.V., Kretova O.V. rDNA clusters make contact with genes that are involved in differentiation and cancer and change contacts after heat shock treatment // *Cells*. 2019. Vol. 8. № 11. P. 1393.
7. Diesch J., Bywater M.J., Sanij E., Cameron D.P., Schierding W., Brajanovski N., Son J., Sornkom J., Hein N., Evers M., Pearson R.B., McArthur G.A., Ganley A.R.D., O’Sullivan J.M., Hannan R.D., Poortinga G. Changes in long-range rDNA-genomic interactions associate with altered RNA polymerase II gene programs during malignant transformation // *Commun. Biol.* 2019. Vol. 2. P. 39.
8. Tchurikov N.A., Klushevskaya E.S., Alembekov I.R., Kretova A.N., Chechetkin V.R., Kravatsky G.I., Kravatsky Y.V. Induction of the Erythroid Differentiation of K562 Cells Is Coupled with Changes in the Inter-Chromosomal Contacts of rDNA Clusters // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24. № 12. P. 9842.
9. Tchurikov N.A., Klushevskaya E.S., Kravatsky Y.V., Kravatsky G.I., Fedoseeva D.M., Kretova O.V. Interchromosomal Contacts of rDNA Clusters with DUX Genes in Human Chromosome 4 Are Very Sensitive to Heat Shock Treatment // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020. Vol. 490. № 1. P. 50–53.

10. Bystricky K., Heun P., Gehlen L., Langowski J., Gasser S.M. Long-range compaction and flexibility of interphase chromatin in budding yeast analyzed by high-resolution imaging techniques. PNAS. 2004. Vol. 101. № 47. P. 16495–16500.
11. Maden B.E., Dent C.L., Farrell T.E., Garde J., McCallum F.S., Wakeman J.A. Clones of human ribosomal DNA containing the complete 18 S-rRNA and 28 S-rRNA genes. Characterization, a detailed map of the human ribosomal transcription unit and diversity among clones // Biochem. J. 1987. Vol. 246. № 2. P. 519–527.
12. Nakamura R.M. Overview and Principles of In-Situ Hybridization // Clinical Biochemistry. 1990. V. 23. № 4. P. 255–259.
13. Bolte S., Cordelières F.P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy // Journal of Microscopy. 2006. Vol. 224. № 3. P. 213–232.
14. Schaap M., Lemmers R.J., Maassen R., van der Vliet P.J., Hoogerheide L.F., van Dijk H.K., Basturk N., de Knijff P., van der Maarel S.M. Genome-wide analysis of macrosatellite repeat copy number variation in worldwide populations: Evidence for differences and commonalities in size distributions and size restrictions // BMC Genomics 2013. 14:143.
15. Lemmers R.J.L.F., van der Vliet P.J., Vreijling J.P., Henderson D., van der Stoep N., Voermans N., van Engelen B., Baas F., Sacconi S., Tawil R., van der Maarel S.M. Cis D4Z4 repeat duplications associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2 // Human Molecular Genetics. 2018. Vol. 27. № 20. P. 3488–3497.
16. Kretova O.V., Fedoseeva D.M., Kravatsky Y.V., Alembekov I.R., Slovohtov I.Y., Tchurikov N.A. Homeotic DUX4 Genes that Control Human Embryonic Development at the Two-Cell Stage are Surrounded by Regions Contacting with rDNA Gene clusters // Molecular Biology. 2019. T. 53. № 2. С. 237–241.
17. Чуриков Н.А., Клушевская Е.С., Кравацкий Ю.В., Кравацкая Г.И., Федосеева Д.М. Меж-хромосомные контакты генов рРНК в трех линиях клеток человека связаны с сайленсингом генов, контролирующих морфогенез // ДАН. Науки о жизни. 2021. Т.496. № 1. С. 70–74.
18. Percharde M., Lin C.J., Yin Y., Guan J., Peixoto G.A., Bulut-Karslioglu A., Biechele S., Huang B., Shen X., Ramalho-Santos M. A LINE1-nucleolin partnership regulates early development and ESC identity // Cell. 2018. Vol. 174. № 2. P. 391–405.e19.
19. Hnisz D., Abraham B.J., Lee T.I., Lau A., Saint-Andre V., Sigova A.A., Hoke H.A., Young R.A. Super-enhancers in the control of cell identity and disease // Cell. 2013. Vol. 155. № 4. P. 934–947.
20. Shrinivas K., Sabari B.R., Coffey E.L., Klein I.A., Boija A., Zamudio A.V., Schuijers J., Hannett N.M., Sharp P.A., Young R.A., Chakraborty A.K. Enhancer Features that Drive Formation of Transcriptional Condensates // Mol Cell. 2019. Vol. 75. № 3. P. 549–561.e7.

HOMEOTIC *DUX4* GENES SHAPE DYNAMIC INTER-CHROMOSOMAL CONTACTS WITH NUCLEOLI IN HUMAN CELLS

E. S. Klushevskaya^a, I. R. Alembekov^a, Y. V. Kravatsky^a, N. A. Tchurikov^{a,*}

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

*e-mail: tchurikov@eimb.ru

Presented by Academician of the RAS P. G. Georgiev

Nucleoli shape inter-chromosomal contacts with genes controlling differentiation and cancer genesis. *DUX4* genes specify transcription factor possessing two homeodomains. Previously, using Circular Chromosome Conformation Capture (4C) approach on population of cells, it was demonstrated that *DUX4* gene clusters form frequent contacts with nucleoli. It was found also that these contacts are almost completely abolished after heat shock treatment. 4C approach as all ligation-mediated methods is capable to detect rather close interactions between chromatin loops in nuclei. In order to independently confirm the formation and the frequency of the contacts in single cells we used FISH approach. Here, we show that *DUX* genes in single cells form stable contacts in all tested HEK293T cells. The contacts after heat shock treatment reversibly retreat up to 1–3 μm distance. We conclude that inter-chromosomal contacts shaping by nucleoli are dynamic and stable providing both the initiation and maintenance of a differentiated state.

Key words: rDNA, *DUX4*, inter-chromosomal contacts, heat shock, FISH

УДК 577.29

ИНДУКЦИЯ ПУТИ PERK-EIF2 α -ATF4 В М1 МАКРОФАГАХ ПРИ СТРЕССЕ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

© 2024 г. О. Е. Колодеева^{1, *}, Д. А. Аверинская¹, Ю. А. Макарова^{1, 2}, О. Е. Колодеева¹

Представлено академиком РАН В.Г. Дебабовым

Поступило 01.04.2024 г.

После доработки 21.04.2024 г.

Принято к публикации 23.04.2024 г.

Ингибирование трансляции может активировать два пути клеточной гибели. Первый путь опосредован aberrациями трансляции, второй вызван стрессом эндоплазматического ретикулума (ЭПР). В данной работе исследовано действие рибосом-инактивирующего белка II типа (РИБ-II) вискумина на макрофаги М1, полученные из клеточной линии ТНР-1. Количество модифицированных рибосом оценивали с помощью ПЦР в реальном времени. Анализ транскриптомов показал, что вискумин вызывает индукцию стресса ЭПР, активируемого сенсором PERK.

Ключевые слова: вискумин, М1 макрофаги, ТНР-1, рибосом-инактивирующий белок, PERK-eIF2 α -ATF4 путь, стресс ЭПР

DOI: 10.31857/S2686738924040138

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

РИБ-II – рибосом-инактивирующие белки II типа; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; UPR – unfolded protein response; RSR – ribotoxic stress response; ERAD – ER-associated degradation; ОТ-кПЦР – количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; ФТ – фактор транскрипции.

Вискумин – это растительный лектин, выделенный из омелы белой (*Viscum album*). Вискумин относится к семейству белков РИБ-II. Еще одним представителем этого семейства является чрезвычайно токсичный белок рицин [1, 2, 3]. Белки РИБ-II – это гетеродимерные гликопротеины, состоящие из двух субъединиц: А (active) и В (binding), связанных дисульфидной связью [4]. А-цепь обладает каталитической активностью и гидролизует N-гликозидную связь аденозина в положении A4324 α -сарцин-рициновой петли 28S рРНК 60S субъединицы эукариотических рибосом [5, 6, 7]. Эта депуринизация приводит к блокировке связывания

фактора элонгации EF-2 с рибосомой, вследствие чего останавливается синтез белка в клетке. Необратимое повреждение рибосом активирует специфический сигнальный путь (ribotoxic stress response, RSR), что в конечном итоге приводит к апоптозу или аутофагии. В-цепь – лектин, который обеспечивает связывание со специфическими клеточными рецепторами [8].

Клиническое применение вискумина (Mistletoe lectin 1) имеет вековую историю [9, 10], однако механизм его терапевтического действия остается неясным. Рассматриваются его противоопухолевые и противовоспалительные эффекты [11, 12]. Семейство РИБ-II насчитывает более десятка белков. Наиболее изученным является рицин. Было показано, что рицин вызывает стресс ЭПР, причем это играет важную роль в реакции клетки на воздействие токсина [13]. Стресс ЭПР возникает в ответ на накопление несвернутых белков в люмене и активирует путь UPR (Unfolded Protein Response). Это изменяет транскрипционные и трансляционные программы клетки, чтобы справиться со стрессовыми условиями [14]. В частности, UPR запускает механизм деградации неправильно свернутых белков в протеасоме (ERAD, ER-associated degradation) и активирует экспрессию шаперонов в ЭПР. В случае, если восстановить жизнеспособность не удастся, UPR индуцирует апоптоз. Существует три основных сигнальных каскада UPR, которые инициируются тремя белковыми сенсорами, локализованными в ЭПР: IRE1 α , PERK и ATF6 [15].

¹НИУ Высшая школа экономики, Факультет биологии и биотехнологии, Москва, Россия

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

*e-mail: oekolodeeva@hse.ru

В физиологических условиях все три сенсора находятся в неактивном состоянии, поскольку связаны с шапероном BiP (HSPA5/GRP78). Этот белок в условиях стресса ЭПР связывается с несвернутыми белками, что приводит к его высвобождению из комплекса с сенсорами и активации сенсоров. Ранее было показано, что обработка клеток ризином активирует только путь, опосредованный IRE1a [13].

В качестве модели изучения стресса ЭПР использовали провоспалительные M1 макрофаги, полученные из клеточной линии THP-1, поскольку макрофаги играют значимую роль в иммунном ответе, являясь основными индукторами воспаления. M1 макрофаги обрабатывали вискумином в диапазоне концентраций от 0.1 до 100 нМ. Цитотоксическое действие вискумина оценивали с помощью метода МТТ. Показано, что 50%-ное ингибирование жизнеспособности (IC50) достигается при концентрации вискумина 4.5 нМ (рис. 1). Небольшое увеличение жизнеспособности клеток при низких концентрациях вискумина может быть связано с тем, что при низких концентрациях он действует как митоген [16]. Чувствительность макрофагов к вискумину оказалась примерно в 1000 раз выше, чем у клеток колоректальной аденокарциномы Сасо-2 [17].

Оценку доли рибосом, инактивированных вискумином, проводили как описано ранее [17]. Вкратце, суть подхода состоит в том, что ревертаза в ходе обратной транскрипции напротив образовавшегося в результате действия токсина AP-сайта встраивает дезоксиаденин. Поэтому синтезированные на интактной и поврежденной матрицах фрагменты кДНК будут отличаться одним нуклеотидом (А вместо Т), что можно детектировать с помощью ПЦР. Обнаружено дозозависимое увеличение количества апуриновых сайтов в 28S рРНК (табл. 1).

Доля модифицированных рибосом в клетках M1 макрофагов после обработки вискумином в концентрации 100 нМ, приводящей к 85% ингибированию жизнеспособности, составила всего 6.45% (рис. 1, табл. 1). Интересно, что, как показано нами ранее, у клеток Сасо-2 при инактивации даже 20% рибосом жизнеспособность не снижается [17]. Эти данные в сочетании с повышенной чувствительностью макрофагов к вискумину позволяют предположить, что цитотоксическое действие вискумина на M1 макрофаги опосредовано не только остановкой трансляции.

С помощью количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР) оценили уровни экспрессии генов стресса ЭПР: PERK, IRE1a, DDIT3, ATF4 и ATF6 [18, 19]. При высоких концентрациях вискумина детектировали статистически значимое увеличение экспрессии всех маркерных генов (рис. 2).

Для анализа путей, активируемых во время стресса, провели высокопроизводительное секвенирование на платформе Illumina. Стандартный биоинформатический анализ включал оценку контроля качества,

обрезку адаптеров, картирование на геном человека и оценку дифференциальной экспрессии. Секвенируемые образцы обрабатывали вискумином в концентрации 1 нМ (концентрация, при которой > 50% клеток сохраняют жизнеспособность) в течение 6 ч с последующей инкубацией в среде без вискумина в течение 24 ч. Анализ транскриптома показал, что в результате 742 гена значительно изменили свою экспрессию (FC > 1.5, FDR p-value < 0.05): экспрессия 552 генов была повышена и 190 генов понижена. Значительная часть генов с повышенной экспрессией вовлечена в воспалительные пути, включая NF-κB путь.

Экспрессия генов, активируемых PERK: ATF4 и DDIT3 (рис. 3), увеличилась в 2.6 и 2.2 раза соответственно, что согласуется с результатами ОТ-кПЦР (рис. 2), а экспрессия PERK, ATF6 и IRE1a значимо не изменилась.

Для всех факторов транскрипции (ФТ) проанализировали изменение экспрессии их генов-мишеней с помощью гипергеометрического теста. В табл. 2 представлены ФТ, активирующие наибольшее число

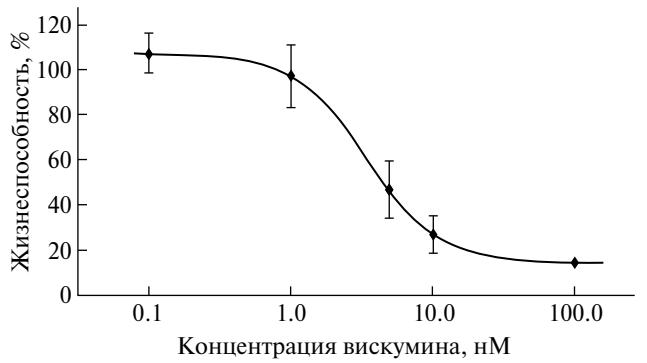


Рис. 1. Кривая жизнеспособности макрофагов M1 при обработке клеток вискумином. Точки на графике представляют среднее значение жизнеспособности по трем биологическим повторам. В качестве планок погрешностей использовали стандартную ошибку среднего. Макрофаги M1, полученные из клеточной линии THP-1, обрабатывали указанными концентрациями вискумина в течение 6 ч с последующей отмывкой и 24-ч инкубацией в культуральной среде.

Таблица 1. Доля апуринизированных молекул в пуле 28S рРНК при обработке макрофагов M1 разными концентрациями вискумина в течение 6 ч и последующей инкубацией в среде без вискумина в течение 24 ч. Эксперимент выполнен в трех биологических повторях.

Концентрация вискумина, нМ	Доля модифицированных 28S рРНК, %
0 (Контроль)	0 ± 0.00
0.1	0.1 ± 0.01
1	1.2 ± 0.3
10	3.8 ± 0.5
100	6.4 ± 0.6

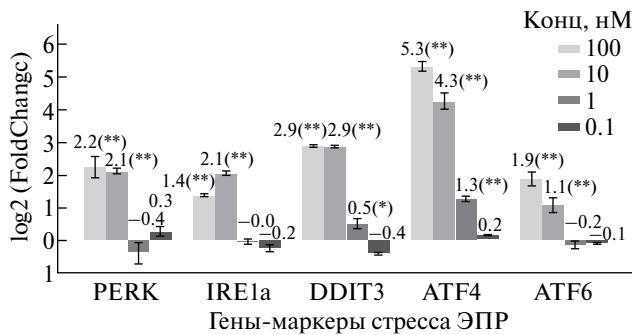


Рис. 2. Оценка индукции стресса ЭПР методом ОТ-кПЦР. Изменение экспрессии $\log_2(FC)$ в обработанных вискумином макрофагах М1 в диапазоне концентраций 0.1 – 100 нМ оценивали относительно контрольных необработанных макрофагов М1 по методу $\Delta\Delta Ct$ [20]. Статистическую значимость оценивали с помощью t-теста Стьюдента с поправкой на множественность методом Бенджамини-Хохберга (** – p -adjusted < 0.005, * – p -adjusted < 0.05). В качестве референсных генов использовали ACTB, GAPDH. Планки погрешностей показывают стандартную ошибку среднего по трем биологическим повторам. Поляризованные макрофаги М1 обрабатывали указанными концентрациями вискумина в течение 6 ч с последующей инкубацией в среде без вискумина в течение 24 ч.

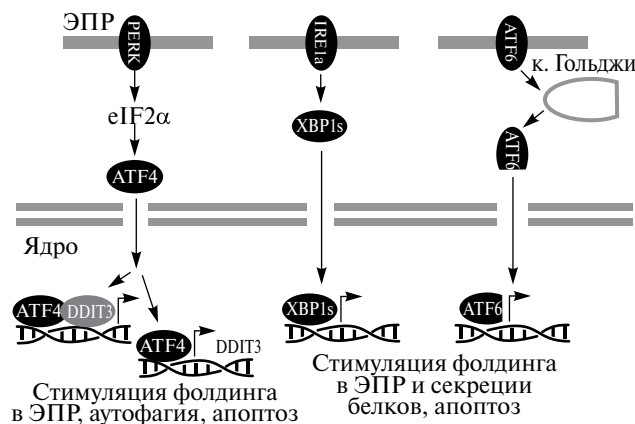


Рис. 3. Схема сигнального пути UPR, индуцируемого стрессом ЭПР. Показаны три каскада UPR, активируемые сенсорами PERK, IRE1a и ATF6.

Таблица 2. ФТ, активирующие наибольшее число мишеней

ФТ	Число мишеней	Отношение шансов	FDR
RELA	158	8.22	0.5e-8
NFKB1	150	8.48	0.5e-8
JUN	64	9.84	0.002
HIF1A	43	9.91	0.005
STAT1	36	10.7	0.004
CEBPB	27	19.1	0.0003
ATF4	21	17.1	0.003

генов-мишеней. Видно, что из трех каскадов UPR активировался только путь PERK-ATF4 (рис. 3, табл. 2).

В число генов-мишеней ATF4 с повышенной экспрессией вошли DDIT3 ($FC = 2.1$, $padj = 4e-11$), участвующий в пути, который активирует сенсор PERK, а также CEBPB ($FC = 1.8$, $padj = 3e-4$), ATF3 ($FC = 2$, $padj = 1.6e-39$), CXCL8 ($FC = 4$, $padj = 6.7e-26$), PPP1P15A/GADD34 ($FC = 3.7$, $padj = 3.2e-125$) и SIRT1 ($FC = 1.6$, $padj = 1.9e-20$), которые активируют воспалительный ответ и апоптоз. Экспрессия ФТ, опосредующих клеточный ответ при активации двух других сенсоров стресса ЭПР – ATF6 и XBP1, а также экспрессия их генов-мишеней значимо не изменилась. Это может свидетельствовать о преимущественном вкладе пути PERK-eIF2 α -ATF4 в активацию механизмов ответа макрофагов М1 на обработку вискумином.

Таким образом, М1 макрофаги обладают высокой чувствительностью к вискумину, которая, вероятно, обусловлена не только стрессом, вызванным повреждением рибосом (RSR). Обработка вискумином приводила к активации стресса ЭПР. Из трех ветвей UPR, активируемых сенсорами стресса ЭПР, наиболее значимым оказался путь PERK-eIF2 α -ATF4. Это может свидетельствовать о важности сенсора PERK в активации ответа М1 макрофагов на воздействие вискумина. Интересно, что ранее для близкого, но более токсичного белка рибина было показано, что он активирует путь, запускаемый сенсором IRE1a, тогда как путь PERK-eIF2 α -ATF4 не активируется [13]. Активация рибинном и вискумином разных путей ответа на стресс ЭПР может вносить вклад в их разную цитотоксичность.

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 моноцитов человека THP-1 (приобретена от ATCC), дифференцированной в провоспалительные макрофаги М1. В исследовании отсутствовало изучение человека и животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что не имеют конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sowa-Rogozńska N. et al.* Intracellular transport and cytotoxicity of the protein toxin ricin // *Toxins*. 2019. T. 11. №. 6. C. 350.
2. *Sweeney E.C. et al.* Mistletoe lectin I forms a double trefoil structure // *FEBS letters*. 1998. T. 431– №. 3. C. 367–370.
3. *Moisenovich M. et al.* Endosomal ricin transport: involvement of Rab4-and Rab5-positive compartments // *Histochemistry and cell biology*. 2004. T. 121. C. 429–439.
4. *Agapov I.I. et al.* Mistletoe lectin dissociates into catalytic and binding subunits before translocation across the membrane to the cytoplasm // *FEBS letters*. 1999. T. 452. №. 3. C. 211–214.
5. *Endo Y., Tsurugi K., Franz H.* The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes The RNA N-glycosidase activity of the protein // *FEBS letters*. 1988. T. 231. № 2. C. 378–380.
6. *Stepanov A.V. et al.* Design of targeted B cell killing agents // *PLoS One*. 2011. T. 6. № 6. C. e20991.
7. *Moisenovich M. et al.* Differences in endocytosis and intracellular sorting of ricin and viscumin in 3T3 cells // *European Journal of Cell Biology*. 2002. T. 81. №. 10. C. 529–538.
8. *Lange T. et al.* Importance of altered glycoprotein-bound N-and O-glycans for epithelial-to-mesenchymal transition and adhesion of cancer cells // *Carbohydrate research*. 2014. T. 389. C. 39–45.
9. *Tonevitsky A.G. et al.* Immunotoxins containing A-chain of mistletoe lectin I are more active than immunotoxins with ricin A-chain // *FEBS letters*. 1996. T. 392. №. 2. C. 166–168.
10. *Bergmann L. et al.* Phase I trial of r viscumin (INN: aviscumine) given subcutaneously in patients with advanced cancer: a study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC protocol number 13001) // *European Journal of Cancer*. 2008. T. 44. №. 12. C. 1657–1662.
11. *Metelmann H.R. et al.* Immunotherapy and immunosurveillance of oral cancers: Perspectives of plasma medicine and mistletoe // *Cancer Immunology: Cancer Immunotherapy for Organ-Specific Tumors*. 2020. C. 355–362.
12. *Schötterl S. et al.* Viscumins functionally modulate cell motility-associated gene expression // *International Journal of Oncology*. 2017. T. 50. №. 2. C. 684–696.
13. *Peterson-Reynolds C., Mantis N.J.* Differential ER stress as a driver of cell fate following ricin toxin exposure // *FASEB BioAdvances*. 2022. T. 4. №. 1. C. 60.
14. *Horrix C. et al.* Plant ribosome-inactivating proteins type II induce the unfolded protein response in human cancer cells // *Cellular and molecular life sciences*. 2011. T. 68. C. 1269–1281.
15. *Boyce M., Yuan J.* Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death // *Cell Death & Differentiation*. 2006. T. 13. №. 3. C. 363–373.
16. *Hoessli D.C., Ahmad I.* Mistletoe lectins: carbohydrate-specific apoptosis inducers and immunomodulators // *Current Organic Chemistry*. 2008. T. 12. № 11. C. 918–925.
17. *Nikulin S.V. et al.* Ribosome inactivation and the integrity of the intestinal epithelial barrier // *Molecular Biology*. 2018. T. 52. №. 4. C. 583–589.
18. *Maltseva D.V. et al.* Biodistribution of viscumin after subcutaneous injection to mice and in vitro modeling of endoplasmic reticulum stress // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2017. T. 163. №4. C. 451–456.
19. *Schröder M., Kaufman R.J.* The mammalian unfolded protein response // *Annu. Rev. Biochem.* 2005. T. 74. C. 739–789.
20. *Krainova N.A. et al.* Evaluation of potential reference genes for qRT-PCR data normalization in HeLa cells // *Applied biochemistry and microbiology*. 2013. T. 49. C. 743–749.

INDUCTION OF THE PERK-EIF2 α -ATF4 PATHWAY IN M1 MACROPHAGES UNDER ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS

O. E. Kolodeeva^{a, #}, D. A. Averinskaya^a, Yu. A. Makarova^{a, b}, O. E. Kolodeeva^a

^a*Faculty of Biology and Biotechnology, HSE University, Moscow, Russian Federation*

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

[#]*e-mail: oekolodeeva@hse.ru*

Presented by Academician of the RAS V.G. Debabov

Translation inhibition can activate two cell death pathways. The first pathway is activated by translational aberrations, the second by endoplasmic reticulum (ER) stress. In this work, the effect of ribosome-inactivating protein type II (RIP-II) viscumin on M1 macrophages derived from the THP-1 cell line was investigated. The number of modified ribosomes was evaluated by real-time PCR. Transcriptome analysis revealed that viscumin induces the ER stress activated by the PERK sensor.

Keywords: viscumin, M1 macrophages, THP-1, ribosome-inactivating protein, PERK-eIF2 α -ATF4 pathway, ER stress