

ИЗВЕСТИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

# СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ



Журнал публикует статьи теоретических и экспериментальных исследований по различным аспектам биологии



# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Номер 3, 2024

---

---

## БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

Морфогенез *in vitro* в каллусах лаванды узколистной *Lavandula angustifolia* Mill.: гистологические аспекты

Н. Н. Круглова, А. Е. Зинатуллина, Н. А. Егорова 297

Морфогенез селезенки в неонатальном периоде у крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора ДДТ

Н. В. Яглова, Б. Б. Гагулаева, С. С. Обернихин, Е. П. Тимохина, В. В. Яглов 307

---

## БОТАНИКА

Фенологический отклик растений различных биоморф на изменение климата в Западной Сибири

Э. С. Фомин, Т. И. Фомина 318

---

## ЗООЛОГИЯ

Видовой состав дефинитивных хозяев трематоды *Bilharziella polonica* (Сем. Schistosomatidae) Южной Карелии (Северо-Запад России)

Г. А. Яковлева 329

Решительность как индивидуальная черта поведения в природной популяции птиц

Т. А. Ильина, А. В. Киселева, А. В. Бушуев, Е. В. Иванкина, А. Б. Керимов 336

---

## ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Дипептид *L*-карнозин ( $\beta$ -аланил-*L*-гистидин) – криопротектор нервной ткани негибернирующих животных

А. А. Мокрушин 346

Лейкоциты и тромбоциты крови малых сусликов (*Spermophilus rugtaeus* Pall.) при зимней спячке и пробуждении

А. М. Джафарова, Ш. И. Чалабов, Н. К. Кличханов 358

Кальций-активируемые хлорные каналы: роль ионов калия

В. Л. Замойский, А. В. Габрельян, В. В. Григорьев 375

---

## ЭКОЛОГИЯ

Флора и растительность озера Арбакалир и источника Чарский Горячий Ключ (Чарская Котловина, Забайкалье)

Б. Б. Базарова, А. П. Куклин, Т. В. Желибо, Л. В. Замана 384

Влияние условий произрастания на рост, развитие и репродуктивный успех <i>Orchis purpurea</i> Huds. в Юго-Восточном Крыму <i>В. Ю. Летухова, И. Л. Потапенко</i>	394
Особенности развития корневых систем древесных пород в постаграрных фитоценозах <i>А. Ю. Карпечко, А. В. Туюнен, Н. В. Геникова, И. А. Дубровина, М. В. Медведева, Е. В. Мошкина, А. В. Мамай</i>	404
Изотопная изменчивость коллагена костей белоспинных альбатросов ( <i>Phoebastria albatrus</i> ) в районе Берингова моря в голоцене <i>О. А. Крылович, С. В. Самсонов, Е. А. Кузьмичева, А. Б. Савинецкий</i>	416

# CONTENTS

---

---

Number 3, 2024

---

---

## DEVELOPMENTAL BIOLOGY

- Morphogenesis *in vitro* in calluses of lavender *Lavandula angustifolia* Mill.: histological aspects  
*N. N. Kruglova, A. E. Zinatullina, N. A. Yegorova* 297
- Spleen Morphogenesis during the Neonatal Period in Rats Exposed to Endocrine Disruptor DDT  
*N. V. Yaglova, B. B. Gagulaeva, S. S. Obernikhin, E. P. Timokhina, V. V. Yaglov* 307
- 

## BOTANY

- Phenological response of plants of different biomorphs to climate change in Western Siberia  
*E. S. Fomin, T. I. Fomin* 318
- 

## ZOOLOGY

- The species composition of the definitive hosts of the trematode *Bilharziella polonica* (Schistosomatidae) of Southern Karelia (Northwestern Russia)  
*G. A. Yakovleva* 329
- Boldness as an Individual Trait of Behaviour in a Natural Population of Birds  
*T. A. Ilyina, A. V. Kiseleva, A. V. Bushuev, E. V. Ivankina, A. B. Kerimov* 336
- 

## ANIMAL AND HUMAN PHYSIOLOGY

- Dipeptide *L*-carnosine ( $\beta$ -alanyl-*L*-histidine) – nervous tissue cryoprotector non-hibernate animals  
*A. A. Mokrushin* 346
- The blood leukocytes and platelets of little ground squirrels (*Spermophilus pygmaeus* Pall.) during hibernation and arousal  
*A. M. Dzhafarova, Sh. I. Chalabov, N. K. Klichkhanov* 358
- Calcium-activated chloride channels. Role of potassium ions  
*V. L. Zamoyski, A. V. Gabrelian, V. V. Grigoriev* 375
- 

## ECOLOGY

- Flora and vegetation in the lake Arbakalir and the spring Charsky Goryachy Klyuch (Charskaya Basin, Transbaikalia)  
*B. B. Bazarova, A. P. Kuklin, T. V. Zhelibo, L. V. Zamana* 384

Impact of growing conditions on vegetation, development and reproductive success of <i>Orchis purpurea</i> Huds. in the South-Eastern Crimea	
<i>V. Yu. Letukhova, I. L. Potapenko</i>	394
Peculiarities of tree root system development in post agricultural forest communities	
<i>A. Yu. Karpechko, A. V. Tuyunen, N. V. Genikova, I. A. Dubrovina, M. V. Medvedeva, E. V. Moshkina, A. V. Mamai</i>	404
Isotopic variability of short-tailed Albatrosses bone collagen ( <i>Phoebastria albatrus</i> ) in the Bering Sea area during the holocene	
<i>O. A. Krylovich, S. V. Samsonov, E. A. Kuzmicheva, A. B. Savinetsky</i>	416

## МОРФОГЕНЕЗ *IN VITRO* В КАЛЛУСАХ ЛАВАНДЫ УЗКОЛИСТНОЙ *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* MILL.: ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

© 2024 г. Н. Н. Круглова\*\*\*, @, А. Е. Зинатуллина\*\*\*, Н. А. Егорова\*

\*НИИ сельского хозяйства Крыма, ул. Киевская, 150, Симферополь, 295043 Россия

\*\*Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение УФИЦ РАН, просп. Октября, 69, Уфа, 450054 Россия

@E-mail: [kruglova@anrb.ru](mailto:kruglova@anrb.ru)

Поступила в редакцию 26.06.2023

После доработки 02.11.2023

Принята к публикации 02.11.2023

Впервые описаны гистологические события, происходящие в каллусах *Lavandula angustifolia* Mill. на начальных этапах культивирования *in vitro* (1 пассаж). Установлено, что неморфогенный каллус представлен главным образом паренхимной тканью с немногочисленными морфогенетическими очагами, по преимуществу дегенерировавшими. В морфогенных каллусах выявлены такие пути морфогенеза *in vitro*, как органогенез *de novo* и непрямой соматический эмбриогенез *in vitro*, а также отмечены множественные развивающиеся морфогенетические очаги. Обсуждается вопрос реализации свойств плюри- и тотипотентности каллусных клеток *in vitro*. Гистологические данные могут быть использованы при выборе направленности применения полученных из каллусов регенерантов этого ценного эфиромасличного и лекарственного растения в различных клеточных технологиях.

**Ключевые слова:** морфогенез, каллусная культура *in vitro*, органогенез *de novo*, соматический эмбриогенез *in vitro*, лаванда узколистная *Lavandula angustifolia* Mill.

**DOI:** 10.31857/S1026347024030014, **EDN:** VBEPNU

Морфогенез как последовательная цепь изменений формы в процессе онтогенеза, приводящая к созданию видоспецифичной пространственной структуры (Бутенко, 1999), остается сложнейшей фундаментальной проблемой биологии развития.

Сложность изучения этого феномена у растений обусловлена не только комплексным характером морфогенетических процессов, их зависимостью от ряда взаимодействующих внутренних и внешних факторов, участием в этом процессе множества генных систем (de Almeida *et al.*, 2015; Gordon-Kamm *et al.*, 2019), но и продолжением морфогенеза в ходе всего онтогенеза особи за счет постоянного функционирования вегетативных и флоральных (репродуктивных) меристем (принцип непрерывности морфогенеза, по: Батыгина, 2014, а также Claßen-Vockhoff *et al.*, 2021; Gaarslev *et al.*, 2021).

Приблизиться к пониманию закономерностей и особенностей морфогенеза интактных растений позволяет модельный подход культуры *in vitro*, дающий возможность изучать сложные морфогенетические процессы и механизмы их регуляции в контролируемых экспериментатором условиях. Методологическим обоснованием использования таких модельных систем служит принцип универсальности путей морфогенеза растений *in vivo* и *in vitro* (Батыгина, 2014).

Перспективными модельными системами в области исследования морфогенеза растений являются культивируемые *in vitro* каллусы — интегрированные системы тканей, возникшие в результате неорганизованной пролиферации клеток эксплантов (по: Бутенко, 1999; Батыгина, 2014).

На примере различных видов растений выявлены такие пути морфогенеза *in vitro* в каллусах, как органогенез *de novo* (по типам: геммогенез, или каулогенез, состоящий в формировании и развитии побега; ризогенез, состоящий в формировании и развитии корня; гемморизогенез, состоящий в формировании и развитии гемморизогенной структуры, объединяющей в своем составе и побег, и корень) и непрямой соматический эмбриогенез *in vitro* (состоящий в формировании и развитии соматического зародыша). Установлено, что некоторые пути и типы морфогенеза *in vitro* в оптимальных условиях дальнейшего культивирования каллусов приводят к регенерации полноценных растений (обзоры: Kruglova *et al.*, 2018; Зинатуллина, 2019; Bidabadi, Jain, 2020; Shin *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2022).

К настоящему времени опубликовано значительное количество экспериментальных данных, касающихся физиолого-биохимических, (эпи)генетических и особенно молекулярных аспектов индуцирования

и прохождения морфогенеза *in vitro* в каллусах. Обобщению экспериментальных данных в этой области исследований посвящено немало обзоров последних лет (Kruglova *et al.*, 2021; Ikeuchi *et al.*, 2022; Shin *et al.*, 2022, и др.).

В литературе также представлены публикации, касающиеся использования гистологических данных при оценке путей и типов морфогенеза *in vitro* в каллусах различного происхождения, полученных из эксплантов представителей многих семейств (Seldimirova *et al.*, 2016b; Kruglova *et al.*, 2023 и др.). Однако важнейшая проблема выявления и оценки гистологических событий при реализации *in vitro* морфогенетического потенциала компетентных клеток каллуса, на наш взгляд, еще далека от окончательного решения. В то же время такого рода исследования чрезвычайно важны, если исходить из принципа взаимодействия и взаимосвязей структуры и функций тканей во время морфогенеза *in vitro*. Кроме того, важно проводить исследование гистологических аспектов морфогенеза *in vitro* в каллусах с привлечением ранее не исследованных в этом отношении хозяйственно ценных видов растений.

Объектом данного исследования явилась лаванда узколистная *Lavandula angustifolia* Mill. — эфиромасличное растение, широко используемое в медицине, парфюмерии, косметике (Паштетский и др., 2018; Salehi *et al.*, 2018). Для этого ценного растения разработан ряд биотехнологий получения регенерантов через этап формирования каллусов различного происхождения (лист, почка, стебель) с последующей индукцией морфогенеза *in vitro* в них (Alwash *et al.*, 2020; Devasigamani *et al.*, 2020; Егорова, 2021). По морфологическим показателям выявлены такие пути морфогенеза в каллусах *L. angustifolia*, как органогенез *de novo* и непрямой соматический эмбриогенез *in vitro* (Falk *et al.*, 2009; Егорова, 2021; Al-Tai, Mohammed, 2022).

В доступной литературе исследований, посвященных гистологическому анализу морфогенеза *in vitro* в каллусах *L. angustifolia*, нами не обнаружено. В немногочисленных публикациях авторы сообщают о результатах гистологических исследований каллусов других представителей рода *Lavandula*. Так, Николакаки, Христодулакис (Nikolakaki, Christodoulakis, 2006) изучали каллусы *L. vera* L. с целью гистохимического выявления в них фармакологически ценных метаболитов. Митрофанова с соавт. (Mitrofanova *et al.*, 2020) провели гистологический анализ каллусов лавандина *L. x intermedia* Emeric ex Loiseleur на питательных средах *in vitro* различного состава.

Важно отметить, что детальные гистологические данные по динамике различных путей морфогенеза в модельных условиях *in vitro* в каллусах *L. angustifolia* необходимы не только для дальнейшего выявления механизмов морфогенеза интактных

растений, но могут внести вклад в совершенствование биотехнологий гарантированного и массового получения регенерантов этого ценного растения. Особенно большое значение имеют данные по гистологическим событиям на начальных этапах культивирования каллусов. Такие данные могут во многом определить приемы регуляции выявленных путей морфогенеза *in vitro*, которые направлены на использование морфогенного потенциала клеток каллусов в конкретной клеточной технологии.

В связи с этим цель данной работы состояла в изучении гистологических аспектов морфогенеза в каллусах лаванды узколистной *L. angustifolia* на начальных этапах их культивирования *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили растения лаванды узколистной *Lavandula angustifolia* Mill. сорта Степная.

Использовали методы культуры *in vitro* органов и тканей растений, как общепринятые (Калинин и др., 1980), так и разработанные авторами для различных клеточных технологий лаванды узколистной (Егорова, 2021). В качестве эксплантов использовали сегменты (5—7 мм) листьев растений, выращенных в условиях закрытого грунта. При введении в культуру *in vitro* материал стерилизовали в 70 % этаноле (40 с) и 50 % растворе препарата Бродофен 10Н (Флорин АО, Венгрия) (12 мин) и трижды промывали автоклавированной дистиллированной водой. Асептические работы проводили в условиях ламинарного бокса БАВнп-01-Ламинар-С-1,2 (Россия).

Для получения каллусов сегменты листьев помещали на питательные среды, содержащие макро-, микросоли и витамины по прописи Мурашиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962). Первичные неморфогенные каллусы получали на среде с добавлением  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты (НУК, Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1.0 мг/л и 6-бензиламинопурина (БАП, Sigma-Aldrich, США) в концентрации 0.5 мг/л (среда МС160, по: Егорова, 2021). Первичные морфогенные каллусы получали на среде с введением 1.0 мг/л тидиазурина (ТДЗ, Sigma, USA) (среда МС554, по: Егорова, 2021). Культивирование эксплантов проводили в пробирках с 10 мл агаризованной питательной среды при температуре  $26 \pm 2$  °С, относительной влажности воздуха 70 %, освещенности 2—3 клк, 16-часовом фотопериоде.

Через 4—6 недель культивирования первичные каллусы обоих типов отделяли от эксплантов, переносили на среду МС160 и культивировали при тех же условиях для получения каллусов 1 пассажа.

Для гистологического анализа фиксировали неморфогенные и морфогенные каллусы 1 пассажа

в стационарной фазе роста (35—40 сут культивирования *in vitro*), когда происходит максимальный прирост биомассы, как это отмечено у лаванды узколистной ранее (Егорова, 2021). Постоянные гистологические препараты готовили согласно (Световой микроскоп ..., 2013) с применением микротомы HM 325 (Microm, Германия) и окрашиванием срезов реактивом Шиффа. Препараты анализировали с использованием светового микроскопа Axio ImagerA1 light microscope (Carl Zeiss, Германия), оснащенного объективом EC Plan-NEOFLURAL, и фотографировали с использованием цифровой камеры AxioCam MRc5 с программным обеспечением Axio Vision 4.7 (Carl Zeiss, Германия).

Прижизненную съемку объектов вели с применением стереомикроскопа Technival 2 (Carl Zeiss, Германия) и цифровой камеры Olympus Camedia C-4000 (Olympus Optical Co., LTD, Япония).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первичные неморфогенные и морфогенные каллусы *L. angustifolia* формировались на поверхности листовых эксплантов через 2—3 недели после их введения в асептическую культуру *in vitro* на соответствующих средах, при этом на морфогенных каллусах, в отличие от неморфогенных, визуально отмечали формирование морфогенных структур.

### *Морфогистологический анализ неморфогенных каллусов L. angustifolia*

Первичные неморфогенные каллусы представляли собой светлые рыхлые недифференцированные образования со множеством инвагинаций (рис. 1, а).

Через 4—6 недель каллусы отделяли от эксплантов и переносили на свежую среду MS160. Пролиферирующие в таких условиях каллусы культивировали в течение 5—6 недель до стационарной фазы роста (1 пассаж).

По морфологическим данным, недифференцированные каллусы 1 пассажа, как и первичные каллусы, светло окрашены, они также характеризуются рыхлой структурой и наличием множества инвагинаций на своей поверхности (рис. 2, а). Согласно гистологическим данным, такие каллусы представлены преимущественно паренхимной тканью с крупными сильновакуолизированными клетками (рис. 2, б).

В толще каллусов имеются немногочисленные группы меристематических клеток, отделенные от окружающих паренхимных клеток (рис. 2, в). Такие группы клеток можно оценить как заложившиеся морфогенетические очаги. В то же время большинство таких морфогенетических очагов дегенерировало (рис. 2, г).

### *Морфогистологический анализ морфогенных каллусов L. angustifolia*

Первичные морфогенные каллусы представляли собой плотные светло-зеленые образования, на поверхности которых отмечены морфогенные структуры (рис. 1, б).

Первичные морфогенные каллусы через 4—6 недель культивирования *in vitro* на среде MS554 отделяли от эксплантов и переносили на среду MS160. Каллусы культивировали в течение 35—40 сут до стационарной фазы роста (1 пассаж). По морфологическим данным, морфогенные каллусы 1 пассажа, и первичные морфогенные каллусы, характеризовались наличием на их поверхности морфогенных структур, в частности ярко-зеленых почек, зачатков листьев (рис. 3, а).

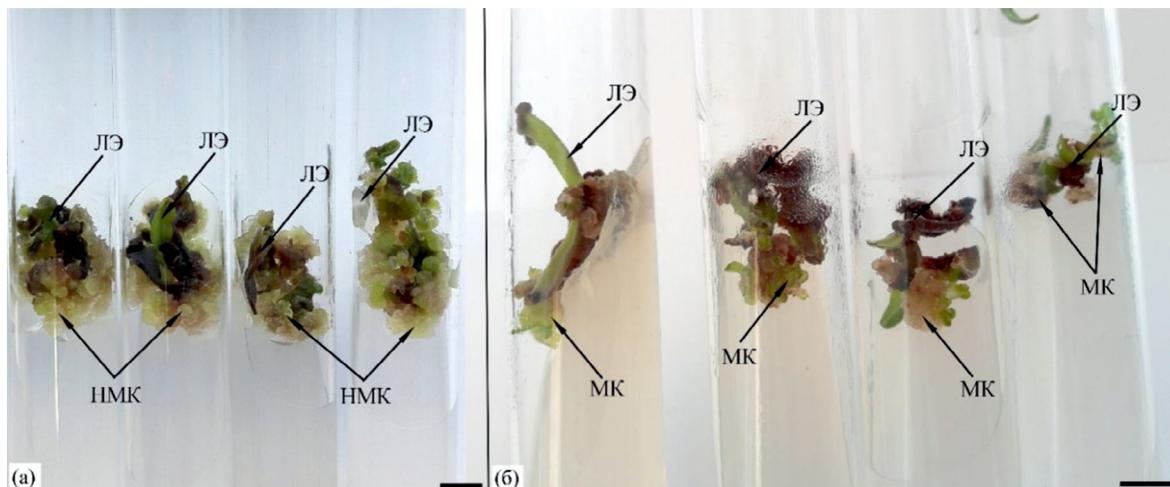
Как показал анализ гистологических данных, морфогенные структуры представляют собой различные образования. Преимущественно это листовые почки на разных стадиях развития: зачаток (рис. 3, б), сформированный апекс (рис. 3, в, г), примордии листа 1 порядка (рис. 3, д), почки (рис. 3, е), а также листья (рис. 3, ж). Обращает на себя внимание асинхронность развития почек. Так, рядом с развитой почкой можно видеть почку с началом заложения примордиев 1 порядка (рис. 3, е).

В целом, в морфогенных каллусах *L. angustifolia* 1 пассажа выявлен и гистологически подтвержден такой путь морфогенеза *in vitro*, как органогенез *de novo*.

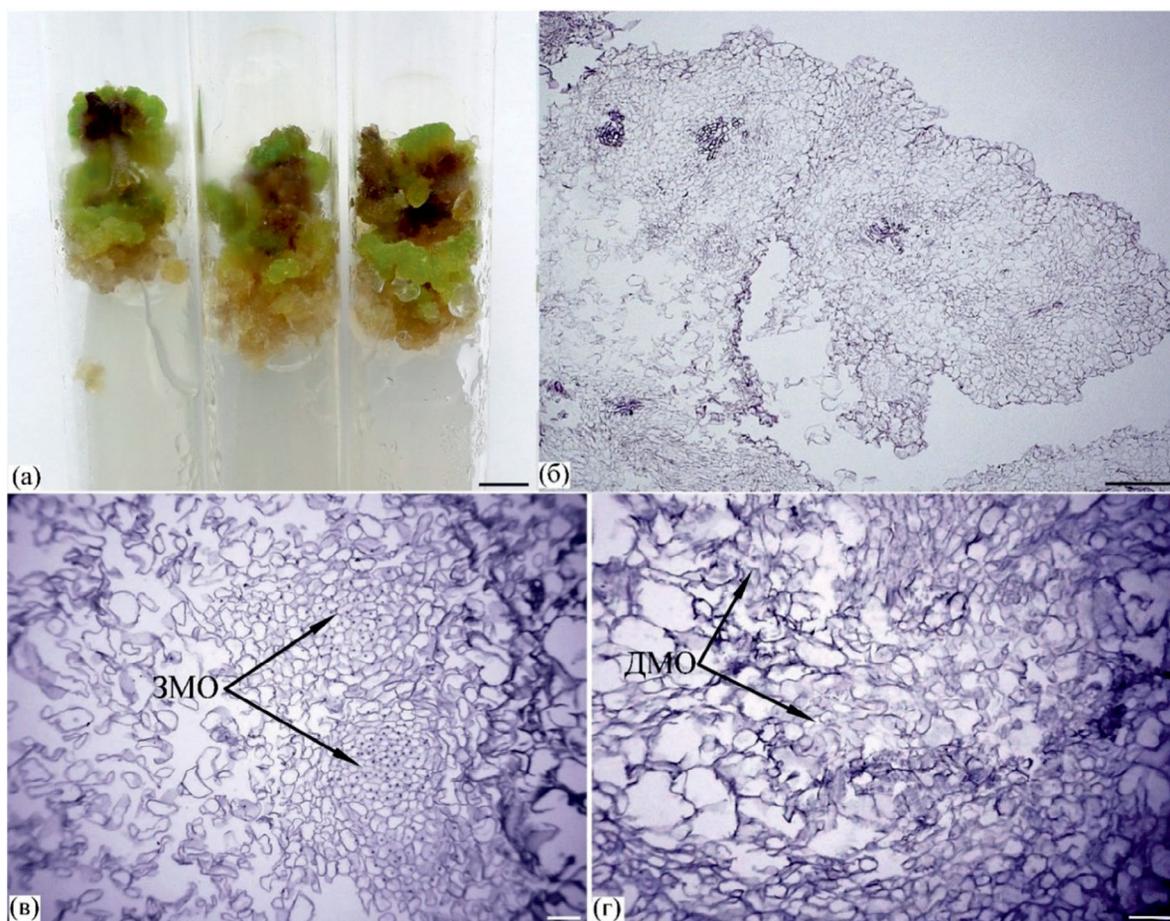
В морфогенных каллусах 1 пассажа также обнаружено формирование морфогенных структур, которые гистологически можно расценить как соматические зародыши. Такие зародыши находятся на ранних стадиях эмбриогенеза — от глобулярной до сердечковидной (рис. 4).

Таким образом, в морфогенных каллусах 1 пассажа *L. angustifolia* выявлено и гистологически подтверждено начало непрямого соматического эмбриогенеза как пути морфогенеза в каллусах *in vitro*.

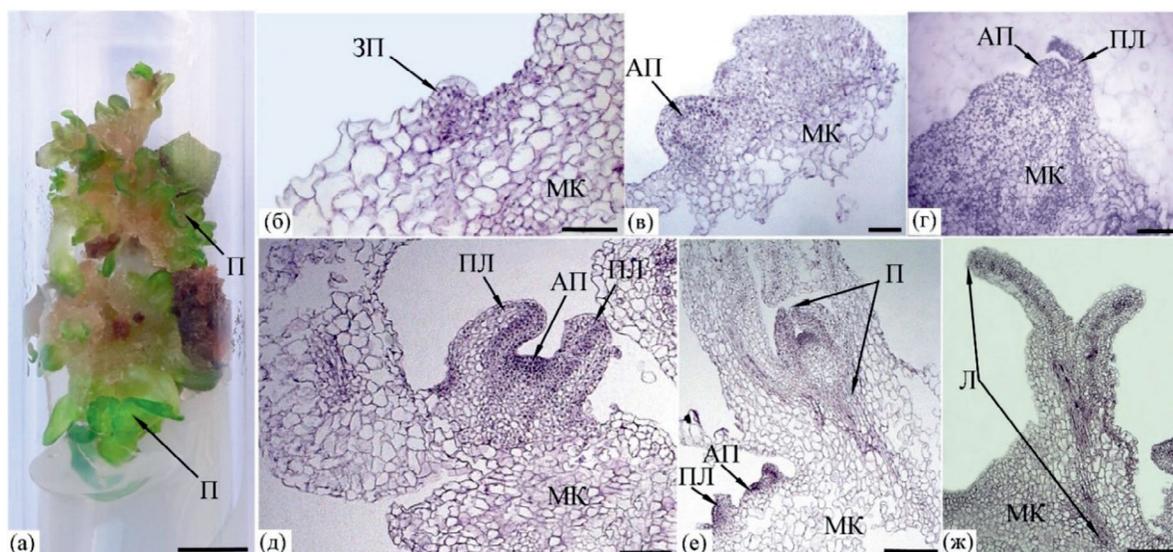
Кроме того, в толще морфогенных каллусов 1 пассажа выявлены многочисленные морфогенетические очаги (рис. 5), которые находятся на разных стадиях развития — от заложившихся до сформированных. Заложившиеся морфогенетические очаги представлены группами меристематических клеток, отделенными от окружающих паренхимных клеток (рис. 5, а—в). Сформированные морфогенетические очаги характеризуются некоторой зональностью структуры. Помимо невакуолизированных меристематических клеток, расположенных по периферии очага, в центральной их части присутствуют более крупные вакуолизированные клетки (рис. 5, б, в). Следует обратить внимание на асинхронность развития органогенных морфогенетических очагов: рядом с заложившимися можно видеть как сформированные очаги (рис. 5, б, в), так и начало преобразования сформированных очагов в меристематические зоны будущих почек (рис. 5, г).



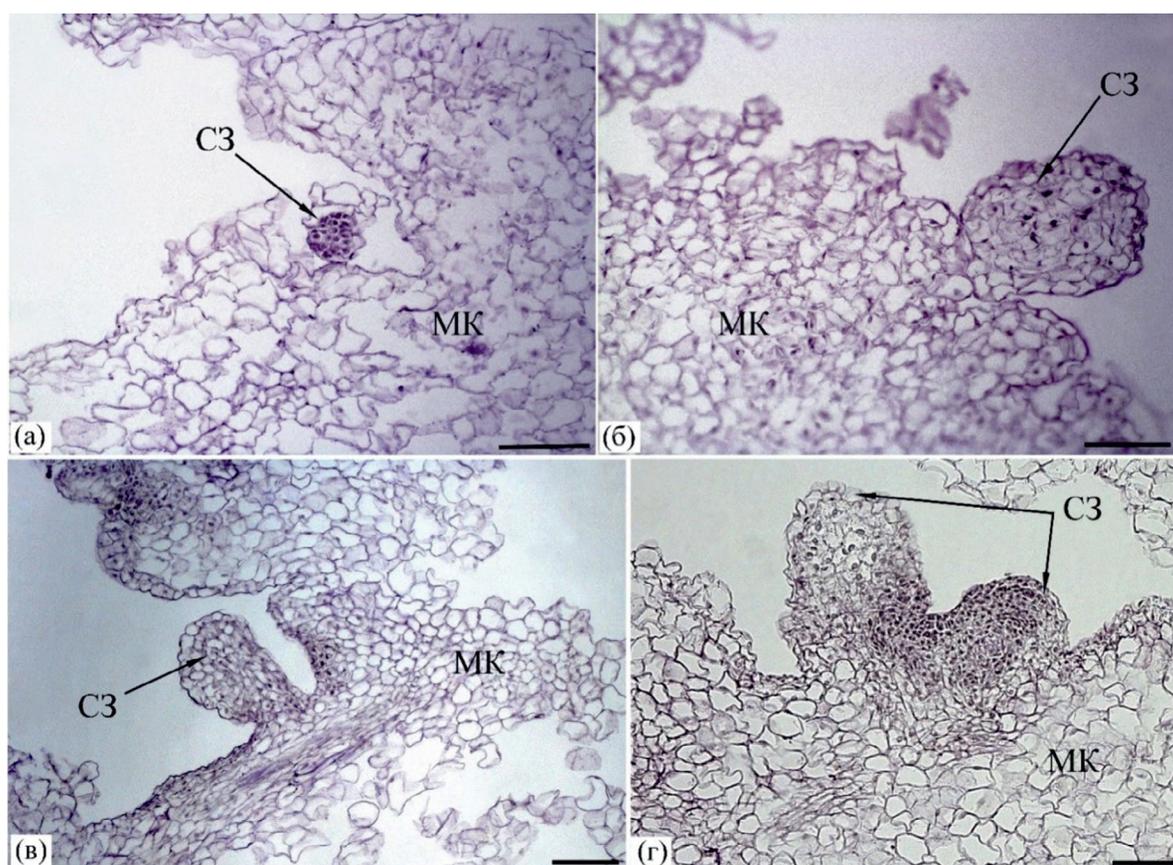
**Рис. 1.** Первичные неморфогенные (а) и морфогенные (б) каллусы *L. angustifolia*. Условные обозначения: ЛЭ — листовой эксплант; МК — морфогенный каллус; НМК — неморфогенный каллус. Масштаб: 10 мм.



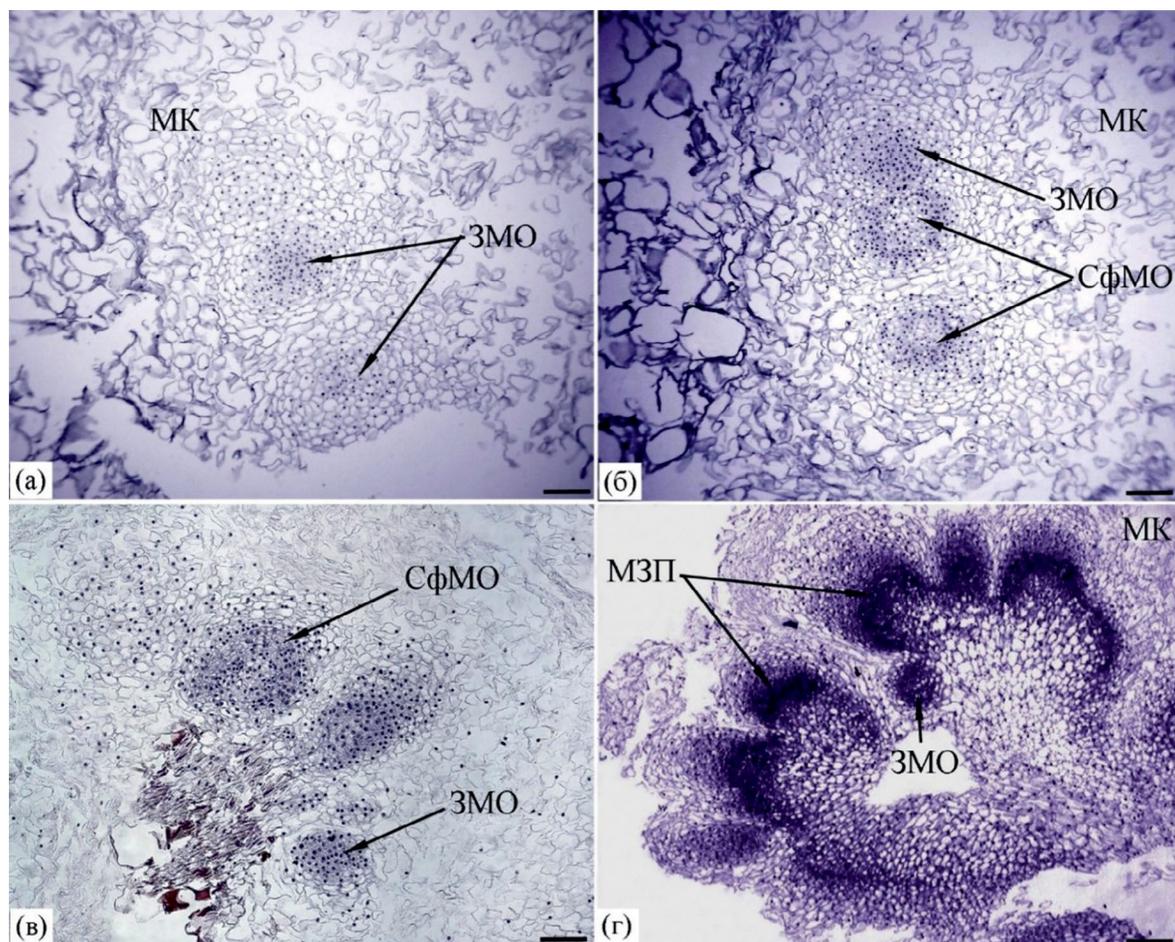
**Рис. 2.** Неморфогенные каллусы *L. angustifolia* 1 пассажа: а — общий вид; б — участки паренхимной ткани (продольный срез); в — заложившиеся морфогенетические очаги (поперечный срез); г — дегенерировавшие морфогенетические очаги (поперечный срез). Условные обозначения: ДМО — дегенерирующий морфогенетический очаг, ЗМО — заложившийся морфогенетический очаг. Масштаб: а — 5 мм, б — 200 мкм, в, г — 50 мкм.



**Рис. 3.** Морфогенные каллусы *L. angustifolia* 1 пассажа: общий вид (а); зачаток почки (б); сформированный апекс почки (в, г); примордии листа 1 порядка (д), почка (е); лист (ж). Все срезы продольные. Условные обозначения: АП — апекс почки, ЗП — зачаток почки, Л — лист, МК — морфогенный каллус, П — почка, ПЛ — примордий листа 1 порядка. Масштаб: а — 5 мм, б, г — 50 мкм, в, д — 100 мкм, е, ж — 200 мкм.



**Рис. 4.** Соматические зародыши ранних стадий эмбриогенеза в морфогенных каллусах *L. angustifolia* 1 пассажа: глобулярный (а, б), переходный к сердцевидному (в), сердцевидный (г) зародыши. Все срезы продольные. Условные обозначения: МК — морфогенный каллус, СЗ — соматический зародыш. Масштаб: а–в — 100 мкм, г — 200 мкм.



**Рис. 5.** Морфогенетические очаги в толще морфогенных каллусов 1 пассажа *L. angustifolia*: а, б — поперечные срезы, в, г — продольные срезы. Условные обозначения: ЗМО — заложившийся морфогенетический очаг, МЗП — меристематическая зона почки, МК — морфогенный каллус, СфМО — сформированный морфогенетический очаг. Масштаб: а–в — 100 мкм, г — 200 мкм.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенных экспериментов из листовых эксплантов *L. angustifolia*, в зависимости от состава индукционной питательной среды, получены два контрастных типа первичных каллусов — неморфогенный и морфогенный (рис. 1). Такие результаты соответствуют как ранее полученным данным по *L. angustifolia* (Егорова, 2021), так и результатам, полученным для других видов растений (обзор: Kruglova *et al.*, 2018).

Впервые полученные нами данные продемонстрировали различия гистологического статуса неморфогенных и морфогенных типов каллусов *L. angustifolia* на начальных этапах культивирования *in vitro* (1 пассаж), что также соответствует высказанному в литературе мнению о гистологических различиях контрастных типов каллусов (обзор: Зинатуллина, 2020).

Известно, что обязательный начальный этап морфогенеза *in vitro* в каллусах любого происхождения

состоит в формировании морфогенетического очага как группы недифференцированных меристематических клеток, обособленной от остального каллуса. Меристематические клетки такого очага морфогенетически компетентны к морфогенезу *in vitro* по различным путям и типам. Морфогенетические очаги постепенно приобретают зональность и преобразуются в меристемы будущих органов (обзоры: Kruglova *et al.*, 2018, 2023; Зинатуллина, 2023).

Формирующиеся морфогенетические очаги выявлены в толще неморфогенных каллусов *L. angustifolia* (рис. 2, в), однако такие очаги немногочисленны и большинство из них дегенерировало (рис. 2, г). Дегенерацию морфогенетических очагов можно расценить как гистологическую основу “неморфогенности” таких каллусов.

Морфогенетические очаги отмечены и в толще морфогенных каллусов *L. angustifolia*. В данном случае очаги, находящиеся на разных стадиях развития — от заложившихся до сформированных, — характеризуются нормальным строением (рис. 5, а–в). Их

наличие можно определить как гистологическую основу будущих путей морфогенеза *in vitro* лабильных морфогенных каллусов, в частности, органогенеза *de novo* по пути формирования почки (рис. 5, г).

В морфогенных каллусах *L. angustifolia* выявлены два пути морфогенеза *in vitro*: органогенез *de novo* и непрямой соматический эмбриогенез *in vitro*.

При органогенезе *de novo* в каллусах представлены листовые почки и листья в динамике развития от зачатков и апексов почек до примордиев и развернутых листьев (рис. 3, б–ж).

При непрямом соматическом эмбриогенезе *in vitro* нами выявлены соматические зародыши только на ранних стадиях эмбриогенеза — от глобулярной до сердечковидной (рис. 4). В то же время в работе Аль-Тай, Мохаммад (Al-Tai, Mohammad, 2022) сообщается о выявленных в каллусах *L. angustifolia* соматических зародышах на различных стадиях развития, вплоть до зрелой семядольной стадии. Следует отметить, что эти авторы дополняли индукционную среду регуляторами роста  $\alpha$ -нафтилуксусной кислотой (НУК, 3.0 мг/л) и 6-бензиламинопурином (БАП, 10.0 мг/л), тогда как в использованной нами индукционной среде присутствовал тидиазурон (ТДЗ, 1.0 мг/л). Кроме того, эти исследователи приводят только морфологические данные по развитию соматических зародышей в каллусах *L. angustifolia*, без гистологического подтверждения полученных результатов.

Важно подчеркнуть, что выявленные пути морфогенеза в каллусах *L. angustifolia* демонстрируют реализацию различных программ развития растительных клеток в условиях культуры *in vitro*. Действительно, органогенез *de novo* следует расценивать как проявление плюрипотентности (способности к формированию нового органа: Батыгина, 2014; Bidabadi, Jain, 2020; Xu, Hu, 2020; Zhai, Xu, 2021; Müller-Xing, Xing, 2022) компетентных клеток каллуса, тогда как непрямой соматический эмбриогенез *in vitro* — как проявление тотипотентности (способности к формированию нового организма: Батыгина, 2014; Feher, 2019; Su *et al.*, 2020) этих клеток.

В литературе разработаны иные концепции реализации морфогенетического потенциала клеток растений и животных (мульти-, омни-, олиго-, унипотентность клеток: Istiaq, Ohta, 2021). В то же время, по нашему мнению, именно свойства плюри- и тотипотентности клеток следует считать базовыми при исследовании путей морфогенеза в каллусах *in vitro*.

Особый интерес вызывает тот результат, что в морфогенных каллусах *L. angustifolia* при одних и тех же начальных условиях культивирования на питательной среде одного и того же состава в 1 пассаже выявлены два пути морфогенеза *in vitro*. Иначе говоря, клетки одного и того же каллуса проявляют свойства плюри- и тотипотентности в одних и тех же условиях. Этот результат соответствует литературным данным, согласно которым в каллусах некоторых растений выявлено формирование или побегов, или

соматических зародышей на среде одного состава — у *Valeriana edulis* ssp. *procera* (Castillo *et al.*, 2000), *Camellia nitidissima* Chi. (Lu *et al.*, 2013), *Metabriggsia ovalifolia* W. T. Wang (Ouyang *et al.*, 2016), *Clematis* sp. (Mitrofanova *et al.*, 2021). Более того, в отдельных немногочисленных случаях отмечено одновременное формирование и побегов, и соматических зародышей в одном и том же каллусе на среде одного состава, например у *Panax ginseng* (Gorpenchenko *et al.*, 2006), *Pogonatherum paniceum* (Wang *et al.*, 2008), *Scaevola sericea* (Liang *et al.*, 2020), *Stipagrostis pennata* (Trin.) De Winter (Asadi-Aghbolaghi *et al.*, 2021).

Авторы этих работ, однако, только констатируют морфологические сведения, без высказывания мнения о возможных клеточных и тканевых механизмах проявления свойств плюри- и/или тотипотентности клеток одного и того же каллуса в условиях *in vitro*. Мы полагаем, что положительную роль в выявлении таких механизмов могут сыграть концепция позиционной информации (Wolpert, 2016), предложенная для оценки пространственно-временной организации морфогенеза в системе целостного организма, и тесно связанная с ней концепция таргетных клеток (Osborne, McManus, 2009), своим индивидуальным позиционным расположением через специфические белковые маркеры детерминированных распознавать специфический эндогенный или экзогенный сигнал к формированию органа (или организма. — *Авт.*). Иными словами, индуцирование двух путей морфогенеза *in vitro* в данном случае определяется гистологически — позиционным расположением в целостной системе каллуса инициальных таргетных клеток/групп таргетных клеток, компетентных к формированию органа (проявление свойства плюрипотентности) или соматического зародыша (проявление свойства тотипотентности). Безусловно, важную роль в индуцировании конкретного пути морфогенеза *in vitro* играют эндогенные гормоны, содержание и распределение которых в таргетных клетках каллуса можно выявить иммуногистохимически, как это показано нами ранее на примере зародышевых каллусов пшеницы (Seldimirova *et al.*, 2016а). Такого рода исследования по отношению к морфогенным каллусам *L. angustifolia* еще предстоит выполнить.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые полученные гистологические данные о двух путях морфогенеза *in vitro* в одном каллусе *L. angustifolia* при одних и тех же условиях культивирования важны для понимания клеточных и тканевых механизмов реализации морфогенетического потенциала каллусных клеток. Действительно, органогенез *de novo* основан на реализации свойства плюрипотентности растительных клеток, тогда как соматический эмбриогенез *in vitro* — свойства их тотипотентности. Все это лишний раз подтверждает

перспективность использования каллусов в качестве экспериментальных систем для изучения биологического феномена морфогенеза растений в модельных контролируемых условиях культуры *in vitro*.

Кроме того, данные о гистологических событиях в процессе морфогенеза *in vitro* в каллусах *L. angustifolia* (наличие динамично развивающихся морфогенетических очагов, два пути морфогенеза *in vitro* в каллусах) могут быть использованы при оптимизации биотехнологических исследований с целью получения регенерантов этого экономически ценного растения. Известно, что при регенерации путем соматического эмбриогенеза *in vitro* с большей вероятностью обеспечивается генетическая стабильность получаемых растений, что позволяет использовать этот путь морфогенеза при массовом клональном микроразмножении растений. С другой стороны, для получения соматических вариантов используется путь органогенеза *de novo*, чаще приводящий к генетическим изменениям регенерантов. Гистологические данные могут быть использованы при выборе направленности применения полученных из каллусов регенерантов *L. angustifolia* в различных клеточных технологиях.

Авторы благодарны к. б. н. Г. Е. Титовой (БИН РАН, г. Санкт-Петербург) за совместное обсуждение представленных микрофотографий.

Исследования выполнены на базе Центра коллективного пользования “Агидель” УФИЦ РАН, а также лаборатории биотехнологии НИИ СХ Крыма.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 23-24-00023.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Батыгина Т. Б. Биология развития растений. Симфония жизни. СПб.: Изд-во ДЕАН, 2014. 712 с.
- Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
- Зинатуллина А. Е. Феномен гемморизогенеза как типа органогенеза *in vitro* в биотехнологических исследованиях хлебных злаков // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 2. С. 116—127. DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-2-116-127.
- Зинатуллина А. Е. Цитофизиологические особенности контрастных типов каллусов *in vitro* // Успехи соврем. биол. 2020. Т. 140. № 2. С. 183—194.
- Зинатуллина А. Е. Формирование морфогенетических очагов как основа гемморизогенеза *in vitro* в зародышевых каллусах пшеницы // Экобиотех. 2023. Т. 6. № 2. С. 81—90. DOI: 10.31163/2618-964X-2023-6-2-81-90.
- Егорова Н. А. Биотехнология эфиромасличных растений: создание новых форм и микроразмножение *in vitro*. Симферополь: ИД “Аврограф”, 2021. 315 с.
- Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии. Киев: Наукова думка, 1980. 468 с.
- Паптецкий В. С., Невкрытая Н. В., Мишнев А. В., Назаренко Л. Г. Эфиромасличная отрасль Крыма. Вчера, сегодня, завтра. Симферополь: ИТ “Ариал”, 2018. 320 с.
- Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений / Н. Н. Круглова, О. В. Егорова, О. А. Сельдимирова, Д. Ю. Зайцев, А. Е. Зинатуллина. Уфа: Гилем, 2013. 128 с.
- Al-Tai A.A.R., Mohammed A. A. Production of Lavender (*Lavandula angustifolia*) Plants from Somatic Embryos Developed from its Seedlings Leaf Callus // Raf. J. Sci. 2022. V. 31. № 4. P. 12—19. DOI: 10.33899/RJS.2022.176073.
- Alwash B. M.J., Salman Z. O., Hamad S. F. Qualitative and quantitative evaluation of active constituents in callus of *Lavandula angustifolia* plant *in vitro* // Bagh. Sci. J. 2020. V. 17. № 2. P. 591—598. DOI: 10.21123/bsj.2020.17.2(SI).0591.
- Asadi-Aghbolaghi M., Dedicova B., Ranade S. S., Le K.-C., Sharifzadeh F., Omidi M., Egertsdotter U. Protocol development for somatic embryogenesis, SSR markers and genetic modification of *Stipagrostis pennata* (Trin.) De Winter // Plant Methods. 2021. V. 17. № 70. DOI: 10.1186/s13007—021—00768—9.
- Bidabadi S. S., Jain S. M. Cellular, Regenerational, and Physiological Aspects of In Vitro Plant Regeneration // Plants. 2020. V. 9. DOI: 10.3390/plants9060702.
- Castillo P., Marquez J., Rubluo A., Georgina Hernandez G., Lara M. Plant regeneration from callus and suspension cultures of *Valeriana edulis* ssp. *procera* via simultaneous organogenesis and somatic embryogenesis // Plant Sci. 2000. V. 151. № 2. P. 115—119. DOI: 10.1016/s0168—9452(99)00203—4.
- Claßen-Bockhoff R., De Craene L.P.R., Becker A. Editorial: From Meristems to Floral Diversity: Developmental Options and Constraints // Front. Ecol. Evol. Sec. Evol. Biol. 2021. V. 9. DOI: 10.3389/fevo.2021.637954.
- de Almeida M., Graner E. M., Brondani G. E., de Oliveira L. S., Artioli F. A., de Almeida L. V., Leone G. F., Baccarin F. J. B., de Oliveira A. P., Cordeiro G. M., Oberschelp G. P. L., Batagin-Piotto K. D. Plant

- morphogenesis: Theoretical bases // *Adv. Forest. Sci.* 2015. V. 2. P. 13—22. DOI: 10.34062/afs.v2i1.2363.
- Devasigamani L., Devarajan R., Loganathan R., Rafath H., Padman M., Giridhar L., Kuppan N. *Lavandula angustifolia* L. plants regeneration from in vitro leaf explants-derived callus as conservation strategy // *Biotecn. Veg.* 2020. V. 20. № 2. P. 75—82.
- Falk L., Biswas K., Boeckelmann A., Lane A., Mahmoud S.S. An efficient method for the micropropagation of lavenders: regeneration of a unique mutant // *J. Essent. Oil Res.* 2009. V. 21. № 3. P. 225—228. DOI: 10.1080/10412905.2009.9700154.
- Fehér A. Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 26. DOI: 10.3389/fpls.2019.00536.
- Gaarslev N., Swinnen G., Soyk S. Meristem transitions and plant architecture — learning from domestication for crop breeding // *Plant Physiol.* 2021. V. 187. № 3. P. 1045—1056. DOI: 10.1093/plphys/kiab388.
- Gordon-Kamm B., Sardesai N., Arling M., Lowe K., Hoerster G., Betts S., Jones T. Using Morphogenic Genes to Improve and Regeneration of Transgenic Plants // *Plants.* 2019. V. 8. DOI: 10.3390/plants8020038.
- Gorpenchenko T.Y., Kiselev K.V., Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Bragina, E.A., Khodakovskaya M.V., Koren O.G., Batygina T.B., Zhuravlev Yu. N. The *Agrobacterium rhizogenes rolC*-gene-induced somatic embryogenesis and shoot organogenesis in *Panax ginseng* transformed calluses // *Planta.* 2006. V. 223. № 3. P. 457—467. DOI: 10.1007/s00425-005-0102-2.
- Ikeuchi M., Iwase A., Ito T., Tanaka H., Favero D.S., Kawamura A., Sakamoto S., Wakazaki M., Tameshige T., Fujii H., Hashimoto N., Suzuki T., Hotta K., Toyooka K., Mitsuda N., Sugimoto K. Wound-inducible *WUSEL-RELEATED HOMEBOX 13* is required for callus growth and organ reconnection // *Plant Physiol.* 2022. V. 188. № 1. P. 425—441. DOI: 10.1093/plphys/kiab510.
- Istiaq A., Ohta K. Ribosome-Induced Cellular Multipotency, an Emerging Avenue in Cell Fate Reversal // *Cells.* 2021. V. 10. № 9. DOI: 10.3390/cells10092276.
- Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A. Callusogenesis as an in vitro Morphogenesis Pathway in Cereals // *Russ. J. Dev. Biol.* 2018. V. 49. № 5. P. 245—259. DOI: 10.1134/S106236041805003X.
- Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E. Cytophysiological features of the Cereal-based Experimental System “Embryo In Vivo — Callus In Vitro” // *Russ. J. Dev. Biol.* 2021. V. 52. № 4. P. 199—214. DOI: 10.1134/S1062360421040044.
- Kruglova N., Zinatullina A., Yegorova N. Histological Approach to the Study of Morphogenesis in Callus Cultures In Vitro: A Review // *Int. J. Plant Biol.* 2023. V. 14. № 2. P. 533—545. DOI: 10.3390/ijpb14020042.
- Lee K., Kim J.H., Park O.S., Jung Y.J., Seo P. Ectopic expression of *WOX5* promoters cytokinin signaling and de novo shoot regeneration // *Plant Cell Rep.* 2022. V. 41. № 12. P. 2415—2422. DOI: 10.1007/s00299-022-02932-4.
- Liang H., Xiong Y., Guo B., Yan H., Jian S., Ren H., Zhang X., Li Y., Zeng S., Wu K., Zheng F., da Silva J.A.T., Xiong Y., Ma G. Shoot organogenesis and somatic embryogenesis from leaf and root explants of *Scaevola sericea* // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. DOI: 10.1038/s41598-020-68084-1.
- Lü J., Chen R., Zhang M., da Silva T., Ma G. Plant regeneration via somatic embryogenesis and shoot organogenesis from immature cotyledons of *Camellia nitidissima* Chi. // *Plant Physiol.* 2013. V. 170. № 13. P. 1202—1211. DOI: 10.1016/j.jplph.2013.03.019.
- Mitrofanova I.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Kuzmina T.N., Chelombit S.V., Mitrofanova O.V. In vitro direct and indirect regeneration of promising lavandin cultivars // *Acta Hort.* 2020. V. 1285. P. 213—219. DOI: 10.17660/ActaHortic.2020.1285.32.
- Mitrofanova I., Ivanova N., Kuzmina T., Mitrofanova O., Zubkova N. In vitro Regeneration of Clematis Plants in the Nikita Botanical Garden via Somatic Embryogenesis and Organogenesis // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. DOI: 10.3389/fpls.2021.541171.
- Müller-Xing R., Xing Q. The plant stem-cell niche and pluripotency: 15 years of an epigenetic perspective // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. DOI: 10.3389/fpls.2022.1018559.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473—497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Nikolakaki A., Christodoulakis N.S. Histological investigations of the leaf and leaf-originated calli of *Lavandula vera* L. // *Isr. J. Plant Sci.* 2006. V. 54. № 4. P. 281—290. DOI: 10.15660/IJPS\_54\_4\_281.
- Osborne D., McManus M. Hormones, Signals and Target Cells in Plant Development. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2009. 268 p.
- Ouyang Y., Chen Y., Lü J., da Silva T.J.A., Zhang X., Ma G. Somatic embryogenesis and enhanced shoot organogenesis in *Metabriggsia ovalifolia* W.T. Wang // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. DOI: 10.1038/srep24662.
- Salehi B., Mnayer D., Özçelik B., Altin G., Kasapoğlu K.N., Daskaya-Dikmen C., Sharifi-Rad M., Selamoglu Z., Acharya K., Sen S., Matthews K.R., Fokou P.V.T., Sharopov F., Setzer W.N., Martorell M., Sharifi-Rad J. Plants of the Genus *Lavandula*: From Farm to Pharmacy // *Nat. Prod. Comm.* 2018. V. 13. № 10. P. 1385—1402. DOI: 10.1177/1934578X1801301037.
- Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N., Zaytsev D. Yu., Veselov S. Yu. Changes in distribution of cytokinins and auxins in cell during callus induction and organogenesis *in vitro* in immature embryo culture of wheat // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 2016a. V. 52. № 3. P. 251—264. DOI: 10.1007/s11627-016-9767-4.
- Seldimirova O.A., Titova G.E., Kruglova N.N. A Complex Morpho-Histological Approach to the *In Vitro* Study of Morphogenic Structures in a Wheat Anther

- Culture // Biol. Bull. 2016b. V. 43. № 2. P. 121—126. DOI: 10.1134/S1062359016020084.
- Shin J., Bae S., Seo P.J. De novo shoot organogenesis during plant regeneration // J. Exp. Bot. 2020. V. 71. № 1. P. 63—72. DOI: 10.1093/jxb/erz395.
- Shin S. Y., Choi Y., Kim S.-G., Park S.-J., Moon K.-B., Kim H.-S., Jeon J. H., Cho H. S., Lee H.-J. Submergence promotes auxin-induced callus formation through ethylene-mediated post-transcriptional control of auxin receptors // Mol. Plant. 2022. V. 15. № 12. P. 1947—1961. DOI: 10.1016/j.molp.2022.11.001.
- Su Y. H., Tang L. P., Zhao X. Y., Zhang X. S. Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming // J. Integr. Plant Biol. 2020. V. 63. № 1. DOI: 10.1111/jipb.12972.
- Wang W., Zhao X., Zhuang G., Wang S., Chen F. Simple hormonal regulation of somatic embryogenesis and/or shoot organogenesis in caryopsis cultures of *Pogonatherum paniceum* (Poaceae) // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2008. V. 95. P. 57—67. DOI: 10.1007/s11240-008-9414-9.
- Wolpert L. Positional information and Pattern Formation // Curr. Top. Dev. Biol. 2016. V. 117. P. 597—608. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2015.11.008.
- Xu C., Hu Y. The molecular regulation of cell pluripotency in plants // *aBIOTECH*. 2020. V. 1. P. 169—177. DOI: 10.1007/s42994-020-00028-9.
- Zhai N., Xu L. Pluripotency acquisition in the middle cell layer of callus is required for organ regeneration // Nat. Plants. 2021. V. 7. № 11. P. 1453—1460. DOI: 10.1038/s41477-021-01015-8.

## Morphogenesis *in vitro* in calluses of lavender *Lavandula angustifolia* Mill.: histological aspects

© 2024 N. N. Kruglova\*\*\*, #, A. E. Zinatullina\*\*\*, N. A. Yegorova\*

\*Research Institute of Agriculture of Crimea, Kievskaya str., 150, Simferopol, 295043 Russia

\*\*Ufa Institute of biology — subdivision of the UFRC RAS, pr. Oktyabrya, 69, Ufa, 450054 Russia

#E-mail: kruglova@anrb.ru

Histological events occurring in the calluses of *Lavandula angustifolia* Mill. at the initial stages of *in vitro* culture (1 passage) were described for the first time. It was found that the non-morphogenic callus is mainly represented by parenchymal tissue with few morphogenetic foci, mostly degenerated. In morphogenic calluses the morphogenesis pathways such as *de novo* organogenesis and indirect *in vitro* somatic embryogenesis have been identified and multiple developing morphogenetic foci have been noted also. The question of the realization of the pluri- and totipotency properties of callus cells *in vitro* is discussed. The histological data can be used in choosing the direction of application of regenerants obtained from calluses of this valuable essential oil and medicinal plant in various cell technologies.

*Kew words:* morphogenesis, callus culture *in vitro*, organogenesis *de novo*, somatic embryogenesis *in vitro*, lavender, *Lavandula angustifolia* Mill.

УДК 591.441:57.044

## МОРФОГЕНЕЗ СЕЛЕЗЕНКИ В НЕОНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ У КРЫС, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ

© 2024 г. Н. В. Яглова<sup>®</sup>, Б. Б. Гагулаева, С. С. Обернихин, Е. П. Тимохина, В. В. Яглов

Научно-исследовательский институт морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ

«Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского», Абрикосовский пер., 2, Москва, 119991 Россия

@E-mail: yaglova@mail.ru

Поступила в редакцию 25.05.2023

После доработки 18.07.2023

Принята к публикации 21.07.2023

Исследован морфогенез селезенки в неонатальном периоде у крыс, подвергавшихся в пренатальном и постнатальном развитии воздействию низких доз дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) – стойкого универсального поллютанта, обладающего свойствами эндокринного дисраптора. Выявлено более интенсивное формирование периартериальных лимфоидных муфт и маргинальной зоны и одновременно снижение темпов дифференцировки В-клеток в селезенке. К концу первой недели жизни было обнаружено большее содержание дифференцирующихся Т-клеток и меньшее число цитотоксических Т-лимфоцитов. Меньшее содержание нейтрофилов в маргинальной зоне указывает на замедление темпов функционального развития лимфоидных образований у крыс, развивавшихся при воздействии низких доз ДДТ.

**Ключевые слова:** селезенка, морфогенез, лимфопоэз, гемопоэз, эндокринный дисраптор, ДДТ.

**DOI:** 10.31857/S1026347024030026, **EDN:** VBBFDT

Иммунная система организма развивается морфологически и функционально и в пренатальном, и в постнатальном периодах онтогенеза (Simon *et al.*, 2015; Moraes-Pinto *et al.*, 2021). Формирование миелоидных и лимфоидных клеточных линий начинается одним из первых в эмбриональном периоде, что делает их более уязвимыми для различных воздействий (Holladay, Smialowicz, 2000; Mc Grath *et al.*, 2015). Известно, что на развитие иммунной системы зародыша оказывают влияние факторы окружающей среды, действующие на материнский организм, что вызывает изменения в темпах морфогенетических процессов, приобретении клетками иммунологической компетенции и параметрах реактивности иммунной системы (Яглова и др., 2012; Georgountzou, Papadopoulos, 2017; Apostol *et al.*, 2020; Elter *et al.*, 2020; Henneke *et al.*, 2021). В настоящее время выраженность антропогенной нагрузки на окружающую среду значительна и во многом обусловлена персистирующим фоновым воздействием системных поллютантов, большая часть которых не представляет угрозы как токсичные вещества, но является эндокринными дисрапторами (Guarnotta *et al.*, 2018; Street *et al.*, 2018). По данным мониторинга, накопление этих соединений в экосистемах негативно влияет на физиологиче- как позвоночных, так и беспозвоночных животных (Huang *et al.*, 2019; Spaan *et al.*, 2019; Cuvillier-Hot, Lenoir, 2020; Martiniuk *et al.*, 2020; Кудрявцева и др.,

2023). У некоторых из эндокринных дисрапторов помимо способности нарушать различные стадии синтеза гормонов и их взаимодействия с клетками-мишенями обнаружены и свойства изменять течение морфогенетических процессов, то есть способность влиять на деление, дифференцировку, миграцию и апоптоз клеток (La Merrill *et al.*, 2020). Дисморфогенетические эффекты были обнаружены у полихлорированных дифенилов, оксibenзонов, бисфенола А, дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ), тетрахлорбензодииоксинов и др. (Dickerson *et al.*, 2011; Forte *et al.*, 2016; La Plante *et al.*, 2018; Yaglova *et al.*, 2023; Yu *et al.*, 2020).

Развитие органов и систем в условиях постоянной антропогенной нагрузки в виде эндокринных дисрапторов изучено в меньшей степени, чем их дисгормональные эффекты. Среди стойких системных поллютантов наибольшей распространенностью в экосистемах характеризуется ДДТ (Mansouri *et al.*, 2017). Это связано не только с массивным использованием его в прошлом веке, но и активным применением в настоящее время для борьбы с переносчиками трансмиссивных заболеваний (World..., 2019). ДДТ, являясь низкомолекулярным липофильным соединением, способен не только депонироваться в организме, но и проникать через плацентарный барьер, обуславливая дисрапторный эффект на материнский организм и плод (Gerber *et al.*, 2016;

Xu *et al.*, 2017). В наших предыдущих исследованиях мы установили дисморфогенетический эффект пренатального и постнатального действия низких доз ДДТ на развитие коркового и мозгового вещества надпочечников (Tsomartova *et al.*, 2018; Yaglova *et al.*, 2023). Результаты исследования показали, что ДДТ влияет на морфогенетические процессы не только во внутриутробном периоде, но и после рождения особи, что проявляется изменением экспрессии транскрипционных факторов, регулирующих пролиферацию и дифференцировку клеток (Yaglova *et al.*, 2021 a, b). В научной литературе также имеются сведения о нарушениях анатомического развития мужской половой системы вследствие пренатального воздействия ДДТ (Bhatia *et al.*, 2005). Эти данные указывают на возможное изменение морфогенетических процессов во многих органах. Эндокринная система, как известно, существенно влияет на морфогенез и функционирование органов иммунной системы (Carvalho *et al.*, 2015; Самотруева и др., 2017). Следовательно, эндокринные дисрапторы могут изменять развитие центральных и периферических органов иммунной защиты, влияя как опосредованно через эндокринную, так и непосредственно, оказывая прямое дисморфогенетическое действие. Большие дозы ДДТ известны своими иммунотоксичными эффектами (Tebourbi *et al.*, 1998; Dutta *et al.*, 2008; Udoji *et al.*, 2010). Воздействие низких доз также способно индуцировать апоптоз лимфоидных клеток (Yaglova *et al.*, 2013). Влияние ДДТ на морфогенетические процессы в органах иммунной системы и его способность изменять программу их развития остаются открытыми вопросами.

Цель работы — изучение морфогенеза селезенки в неонатальном периоде у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на самцах крыс Вистар ( $n = 58$ ). За животными, содержащимися в виварии, осуществлялся уход по нормам и правилам обращения с лабораторными животными в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985 г.), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ МЗ РФ от 19.06.2003 № 267) и законом «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации» (гл. V, статья 11 Федерального закона от 27.12.2018 № 498-ФЗ).

Крысы опытной группы ( $n = 28$ ) были получены от самок (филиал «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий), которые с первого дня ссаживания с самцами в течение всей беременности и периода лактации вместо воды получали раствор

о, *n*-ДДТ (концентрация 20 мкг/л). Потребляемые дозы ДДТ учитывались ежедневно. Потребление ДДТ самками в течение беременности и лактации составило  $2.72 \pm 0.18$  мкг/кг, что соответствует уровню потребления данного вещества населением с продуктами питания с учетом различий в метаболизме ДДТ человека и крысы (Yamazaki *et al.*, 2010; Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011, 2015). Самки крыс контрольной группы потребляли водопроводную воду. Отсутствие ДДТ и его метаболитов, а также родственных хлорорганических соединений в лабораторном корме и водопроводной воде было установлено методом газожидкостной хроматографии. Животных опытной и контрольной групп выводили из эксперимента передозировкой хлороформного наркоза в два этапа: в первые 6 часов после рождения и в возрасте 7 суток.

Определяли массу тела и массу селезенки с помощью аналитических весов («Сартогосм», Россия), а также рассчитывали относительную массу органа. Селезенку фиксировали в жидкости Буэна и после стандартной проводки изготавливали срезы, которые затем окрашивали гематоксилином и эозином. Для компьютерной морфометрии использовали программу ImageScope (Leica Microsystems, Германия).

Получали суспензию клеток селезенки. Клетки селезенки выделяли путем гомогенизации селезенки в среде RPMI 1640 («ПанЭко», Россия) с продавливанием через сетки с отверстиями 40 мкм для отделения от стромы. Клеточную взвесь дважды отмывали в той же среде центрифугированием 1000 x g, 5 мин. Доводили взвесь до концентрации 10 млн клеток в 1 мл. Проводили цитофлуориметрическое исследование клеток селезенки с использованием антител к антигенам CD45R, CD3, CD4, CD8, конъюгированных с флуорохромами (eBioscience, США) для определения содержания В-лимфоцитов и субпопуляций Т-клеток. Исследовали не менее 100000 клеток в каждом образце. Процедуру подготовки для цитофлуориметрического исследования проводили по стандартным протоколам. Для исследования использовали проточный цитометр FC500 (Beckman Coulter, Германия).

Полученные данные подвергали статистическому анализу с помощью программы Statistica 7.0 (Statsoft Inc., США). Для описания количественных признаков проводили анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения с использованием критериев Колмогорова–Смирнова, Лиллиефорса, Шапиро–Уилка. Для описания центральных тенденций и рассеяния количественных признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, использовали среднее значение и стандартную ошибку среднего значения ( $M \pm m$ ). Сравнение независимых групп по количественному признаку проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий, по качественному признаку — с помощью  $\chi^2$ . Статистически значимыми различия считались при  $p < 0.01$ .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Анатомические параметры развития селезенки крыс.* У новорожденных животных контрольной группы селезенка представляла собой крупное продольное образование темно-красного цвета и была покрыта тонкой соединительнотканной оболочкой. Селезенка новорожденных крыс, развивавшихся при воздействии низких доз эндокринного дисраптора ДДТ, не имела анатомических отличий, ее масса, как абсолютная, так и относительная, соответствовала значениям контрольной группы (рис. 1). К концу первой недели жизни у крыс контрольной группы абсолютная масса селезенки увеличилась в 4 раза, относительная — в 2.5 раза. У крыс, развивавшихся при воздействии ДДТ, отмечалось аналогичное увеличение анатомических параметров.

*Морфогенез белой пульпы селезенки.* Селезенка новорожденных крыс контрольной группы состояла из сформированной ретикулярными клетками сетчатой структуры, включающей большое количество кровеносных сосудов. В центре органа встречалась, как правило, одна артериола, вокруг которой начинала формироваться лимфоидная муфта (рис. 2а, в).

У крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ, в центральной части селезенки встречались 2—3 артериолы, вокруг которых формировались лимфоидные муфты (рис. 2б, в). Толщина лимфоидных муфт была меньше, чем у крыс контрольной группы (рис. 2г).

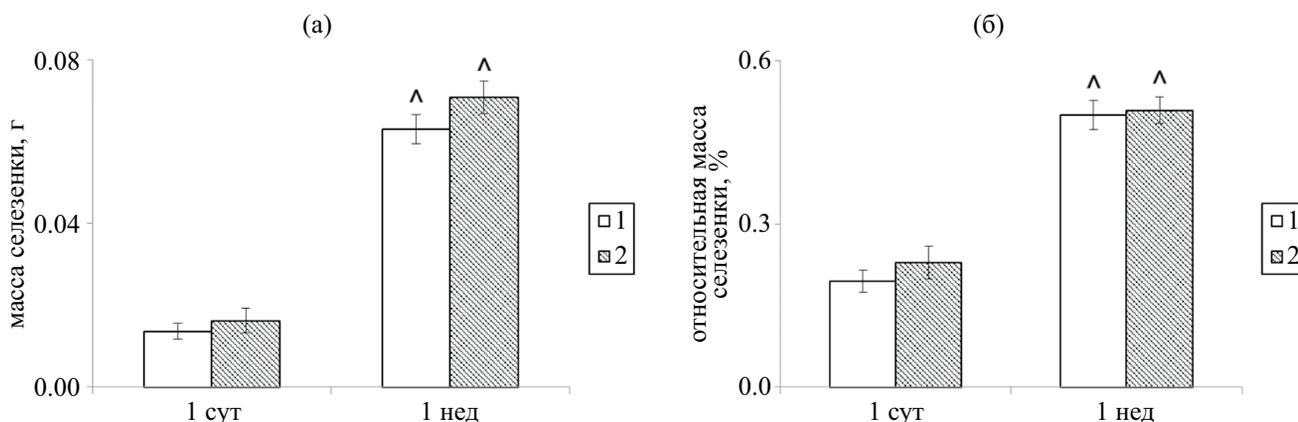
Через неделю у крыс контрольной группы в селезенке отчетливо выделялась белая пульпа, представленная плотно лежащими скоплениями лимфоцитов вокруг артериол (рис. 3а, в). У каждой четвертой лимфоидной муфты выявлялась формирующаяся маргинальная зона (рис. 3б). Маргинальная зона содержала мононуклеарные клетки и небольшое количество нейтрофилов (рис. 3е).

У крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ, в аналогичном возрасте также отмечалось развитие периактериальных лимфоидных муфт (ПАЛМ) и формирование маргинальной зоны, но имелся ряд отличий. Белая пульпа была развита в большей степени (рис. 3а). Это было связано как с большими по размеру лимфоидными муфтами, так и с большей маргинальной зоной (рис. 3г). Маргинальная зона присутствовала у половины лимфоидных муфт (рис. 3б). Однако плотность клеток как в лимфоидных муфтах, так и в маргинальной зоне была меньше, чем в контроле (рис. 3в, д). Отличительной особенностью маргинальной зоны крыс, подвергавшихся низкодозовому воздействию эндокринного дисраптора, было отсутствие нейтрофилов в маргинальной зоне (рис. 3е).

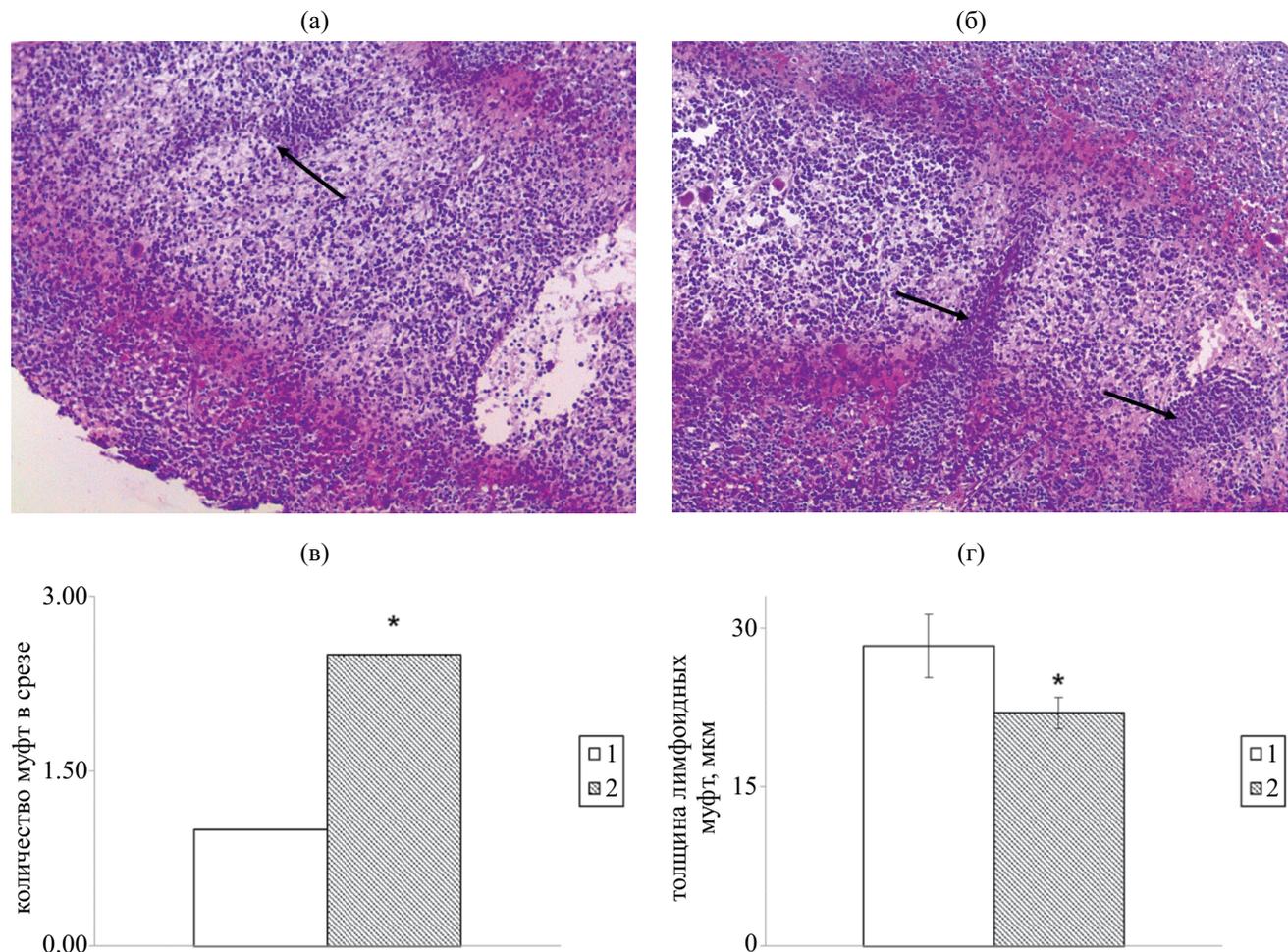
*Динамика морфофункциональных характеристик красной пульпы селезенки.* У новорожденных крыс контрольной группы красная пульпа содержала большое количество мононуклеарных гемопоэтических клеток (рис. 4а). Полиморфноядерные клетки встречались реже (рис. 4б). В наружной части органа наблюдалось скопление эритроцитов. Также в селезенке новорожденных крыс контрольной группы встречалось небольшое количество мегакариоцитов (рис. 4в). Соединительнотканые трабекулы в селезенке были не сформированы (рис. 2а).

В селезенке новорожденных крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ, также наблюдалось большое число гемопоэтических клеток. Общая численность клеток не отличалась от значений контрольной группы (рис. 4а), но гранулоциты встречались крайне редко (рис. 4б). Количество мегакариоцитов в селезенке не имело существенных отличий от контрольных значений (рис. 4в). Трабекулы в структуре селезенки не выявлялись (рис. 2б).

Через неделю у крыс контрольной группы в красной пульпе селезенки появились тонкие соединительнотканые трабекулы. Содержание клеток в красной



**Рис. 1.** Изменения абсолютной (а) и относительной (б) масс селезенки в первую неделю жизни у крыс контрольной группы (1) и развивавшихся под воздействием низких доз ДДТ (2) ( $M \pm m$ ). ^ — статистически значимые отличия от соответствующих значений в 1-е сутки постнатального развития, \* — от значений контрольной группы ( $p < 0.01$ ).



**Рис. 2.** Характеристика белой пульпы у новорожденных крыс контрольной группы и развивавшихся под воздействием низких доз ДДТ: а — структура селезенки новорожденной крысы контрольной группы; б — структура селезенки крысы, подвергавшейся пре- и постнатальному воздействию низких доз ДДТ. Стрелками указаны формирующиеся ПАЛМ. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100; в — количество лимфоидных муфт в срезе селезенки ( $M \pm m$ ); г — толщина лимфоидных муфт ( $M \pm m$ ). \* — от значений контрольной группы ( $p < 0.01$ ).

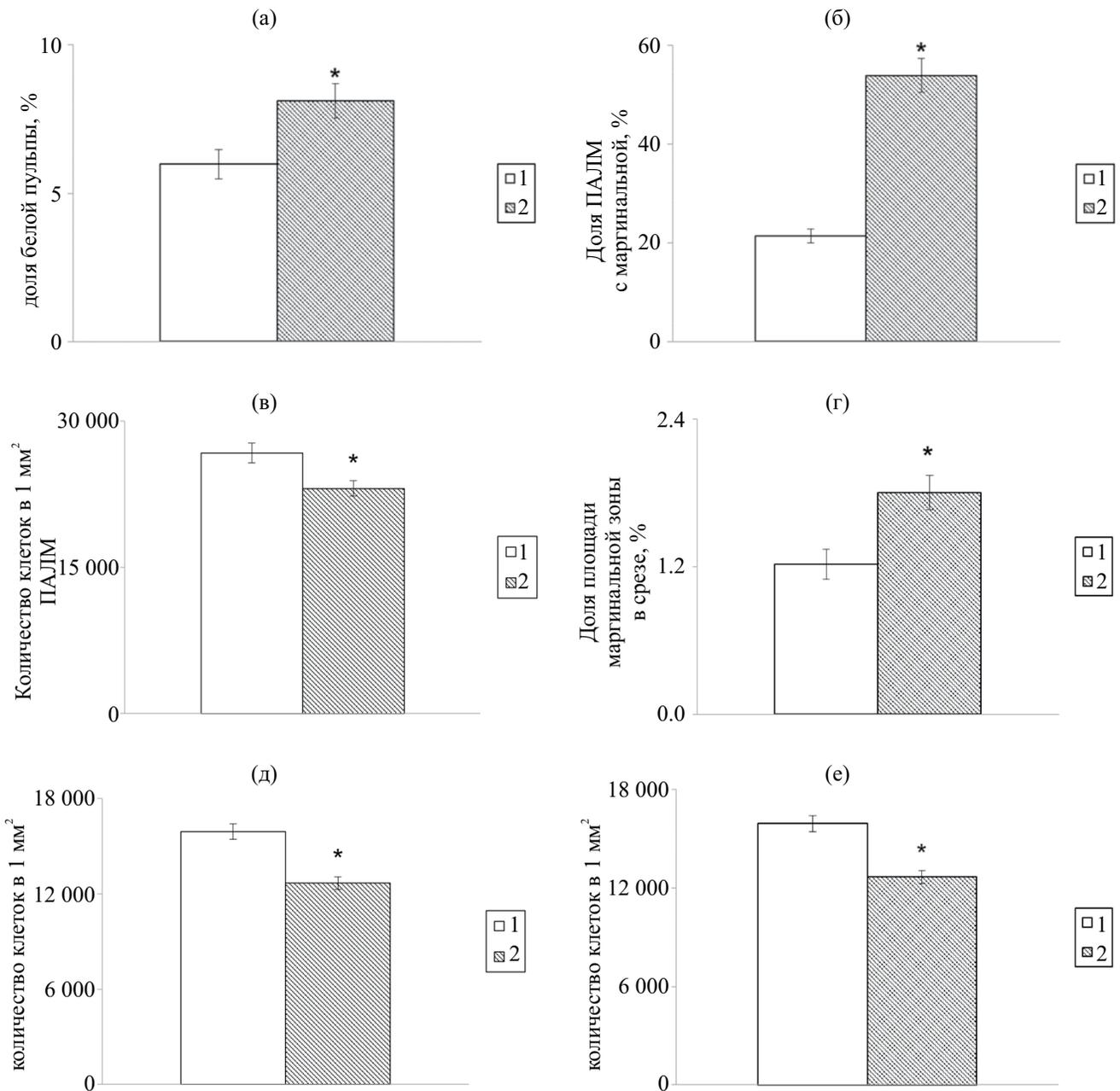
пульпе увеличилось по сравнению с предыдущим сроком в среднем на 20 %, однако процентное содержание нейтрофилов значительно уменьшилось (рис. 4а, б). Численность мегакариоцитов, напротив, возросла (рис. 4в).

У крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ, в конце первой недели жизни в красной пульпе также наблюдалось формирование трабекул и увеличение содержания клеток. При этом уменьшения содержания нейтрофилов не происходило, вследствие чего их процент превысил значения контрольной группы. Численность мегакариоцитов в единице площади красной пульпы увеличилась с возрастом и не отличалась от значений контрольной группы (рис. 4).

*Возрастная динамика субпопуляционного состава лимфоцитов селезенки.* Цитофлуориметрическое исследование показало, что у новорожденных крыс контрольной группы третья часть клеток суспензии

клеток селезенки составляют  $CD45R^+$ -клетки, то есть дифференцированные В-лимфоциты, а содержание Т-клеток примерно в десять раз меньше (рис. 5а, б). Дифференцированные  $CD3^+CD8^+$  цитотоксические лимфоциты составляли 40 % Т-клеток. На долю  $CD3^+CD4^+$  Т-хелперов приходилось чуть более четвертой части. Оставшиеся Т-клетки являлись дифференцирующимися  $CD3^+CD4^+CD8^+$ -лимфоцитами (рис. 6). У новорожденных крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора, содержание В-лимфоцитов было в два раза меньше (рис. 5а). Содержание Т-клеток было меньше на треть (рис. 5б). Но соотношение Т-цитотоксических, Т-хелперных и дифференцирующихся субпопуляций Т-клеток не отличалось от значений контрольной группы (рис. 6).

В возрасте 7 суток у крыс контрольной группы выявлено двукратное снижение доли В-клеток в суспензии клеток селезенки (рис. 5а). Содержание

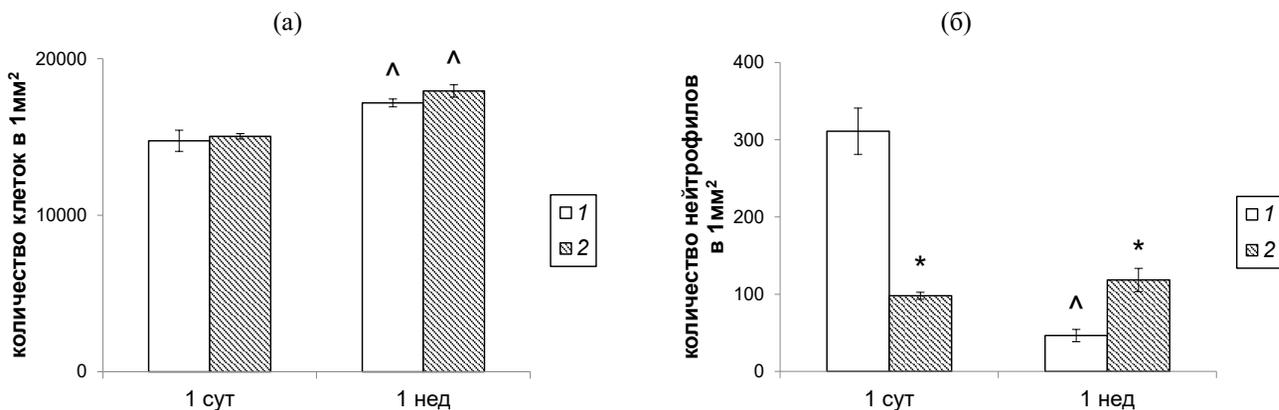


**Рис. 3.** Характеристика белой пульпы у 7-дневных крыс контрольной группы и развивавшихся под воздействием низких доз ДДТ ( $M \pm m$ ): а — доля белой пульпы в селезенке; б — доля ПАЛМ с маргинальной зоной; в — количество клеток в 1 мм<sup>2</sup> ПАЛМ; г — доля площади маргинальной зоны в срезе селезенки; д — количество клеток в 1 мм<sup>2</sup> маргинальной зоны; е — количество нейтрофилов в 1 мм<sup>2</sup> маргинальной зоны. \* — от значений контрольной группы ( $p < 0.01$ ).

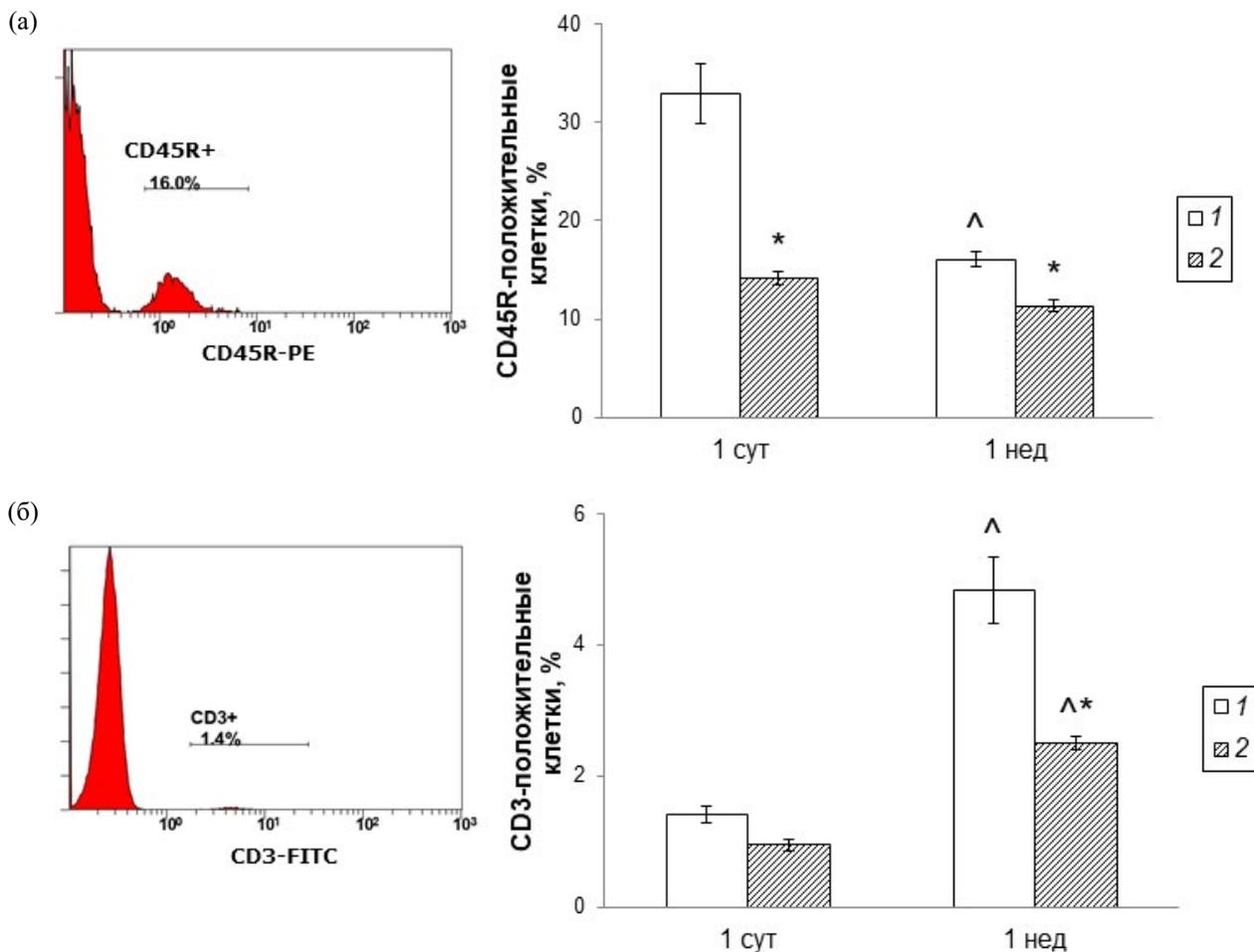
Т-клеток увеличилось более чем в три раза (рис. 5б). Произошли существенные изменения в популяции Т-клеток. Доля Т-цитотоксических лимфоцитов уменьшилась, а Т-хелперов увеличилась. Значительно снизилось содержание дифференцирующихся двойных позитивных Т-клеток (рис. 6).

У крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора, в конце первой недели жизни

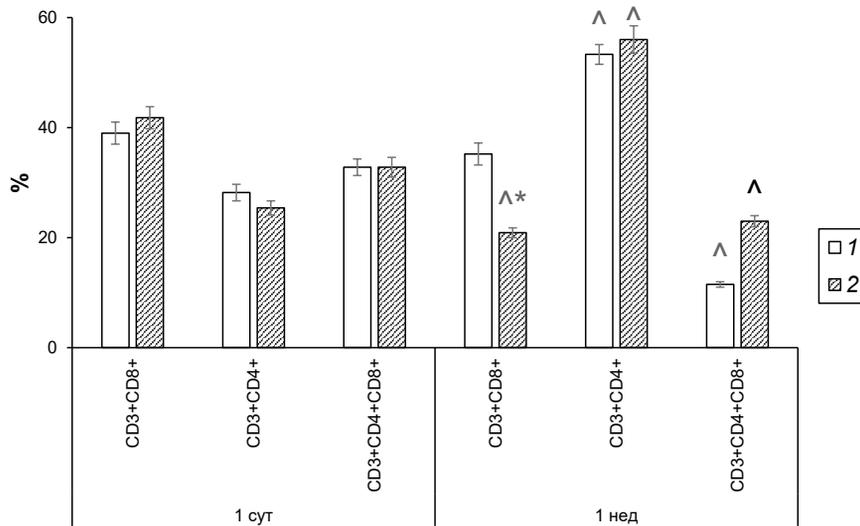
содержание В-клеток в суспензии клеток селезенки незначительно снизилось и было меньше, чем в контрольной группе (рис. 5а). Численность Т-клеток значительно повысилась, но не достигла значений возрастного контроля (рис. 5б). Доля Т-хелперов в популяции Т-клеток увеличилась и не отличалась от значений контрольной группы, а доля Т-цитотоксических лимфоцитов была меньше, чем



**Рис. 4.** Морфофункциональные характеристики красной пульпы селезенки в первую неделю жизни у крыс контрольной группы и развивавшихся под воздействием низких доз ДДТ ( $M \pm m$ ): а — общее количество клеток в 1 мм<sup>2</sup> красной пульпы; б — количество нейтрофилов в 1 мм<sup>2</sup> красной пульпы; в — количество мегакариоцитов в 1 мм<sup>2</sup> красной пульпы. \* — от значений контрольной группы ( $p < 0.01$ ).



**Рис. 5.** Возрастная динамика содержания (а) В- и (б) Т-лимфоцитов селезенки крыс контрольной группы и развивавшихся под воздействием низких доз ДДТ ( $M \pm m$ ). \* — от значений контрольной группы ( $p < 0.01$ ).



**Рис. 6.** Возрастная динамика субпопуляционного состава Т-лимфоцитов селезенки крыс контрольной группы и развивавшихся под воздействием низких доз ДДТ ( $M \pm m$ ). \* — от значений контрольной группы ( $p < 0.01$ ).

в контроле. Процент дифференцирующихся двойных позитивных клеток вдвое превышал значения контрольной группы (рис. 6).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что из-за короткого срока внутриутробного развития у грызунов формирование паренхимы селезенки происходит в течение двух недель после рождения особи (Holladay, Smialowicz, 2000). В этот период селезенка также является активным очагом экстрамедуллярного кроветворения (Losco, 1992; Massberg *et al.*, 2007). Проведенное исследование показало, что процессы, происходящие в селезенке в течение первой недели жизни интактных и развивавшихся в условиях низко дозового воздействия ДДТ крыс, имеют отличия как в процессах формирования лимфоидных образований, так и гемопоэза.

Первым этапом формирования лимфоидных образований в селезенке является образование примитивной ПАЛМ, состоящей в основном из Т-лимфоцитов. У крыс, развивавшихся в условиях воздействия низких доз ДДТ, этот процесс происходил более интенсивно, о чем свидетельствовало большее количество лимфоидных муфт. Их меньшая толщина объясняется тем, что формирующие ПАЛМ Т-клетки являются иммигрантами из тимуса, то есть их количество было ограничено, но распределение их среди большего количества артериол свидетельствует о более активном выделении хемокинов стромальными клетками селезенки (Cheng *et al.*, 2019). Цитофлуориметрический анализ показал адекватное контролю содержание Т-клеток в селезенке, что также указывает на более выраженную продукцию хемоаттрактантов, чем более активную иммиграцию Т-лимфоцитов из тимуса. К концу первой недели жизни у ПАЛМ селезенки

крыс обеих групп начинала формироваться маргинальная зона, что соответствует литературным данным о начале образования маргинальной зоны в 5–10-е сутки постнатального развития (Takeya, Takahashi, 1992; Kraal, Mebius, 2006). У крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора, маргинальная зона развивалась также более интенсивно. Это означает, что у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ, более активно формируются зоны контакта иммунокомпетентных клеток с антигеном (Haley, 2017). В маргинальной зоне содержатся макрофаги, маргинальные металлофильные макрофаги и В-клетки маргинальной зоны, а также транзитные клетки крови, включая лимфоциты и нейтрофилы. Появление нейтрофильных гранулоцитов в селезенке начинается еще во внутриутробном периоде и продолжается после рождения особи, что связано с колонизацией кишечника микрофлорой и поступлением липополисахаридов в системный кровоток (Puga *et al.*, 2011). В маргинальной зоне нейтрофилы участвуют в стимуляции синтеза нейтрализующих бактериальные антигены иммуноглобулинов В-клетками (Puga *et al.*, 2011). У крыс контрольной группы в маргинальной зоне присутствовали нейтрофилы, что свидетельствует о начале формирования иммунного процесса, связанного с поступлением бактериальных антигенов собственной микрофлоры в кровоток. У крыс, развивавшихся при воздействии низких доз ДДТ, меньшая плотность клеток в маргинальной зоне могла быть связана с ее большей площадью, но отсутствие в ней нейтрофилов указывает на замедление формирования реакции иммунокомпетентных органов на антигены. Возможной причиной пониженного содержания нейтрофилов может быть и меньшая интенсивность гранулоцитопоза в селезенке. Но результаты исследования позволяют исключить эту гипотезу, поскольку общее

число гемопоэтических клеток и мегакариоцитов в единице площади красной пульпы не имело отличий, а содержание гранулоцитов в ней в три раза превышало значения контрольной группы. Также можно предположить, что отсутствие нейтрофилов в маргинальной зоне обусловлено незрелостью лимфоцитов. Цитофлуориметрическое исследование лимфоцитов показало меньшее содержание дифференцированных В- и Т-клеток в селезенке крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ, к концу первой недели постнатального развития, что позволяет считать его наиболее вероятной причиной отсутствия нейтрофилов в маргинальной зоне.

Оценивая кроветворную функцию селезенки, необходимо отметить, что у крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора, содержание гемопоэтических клеток в красной пульпе не отличалось от значений контрольной группы в обоих возрастах. Однако исследование субпопуляционного состава лимфоцитов показало значительно меньшее содержание В-клеток как у новорожденных, так и у 7-дневных крыс. Также важным отличием было отсутствие характерного снижения численности дифференцированных В-клеток к 7-м суткам, ярко выраженного в контрольной группе и связанного с постепенной элиминацией материнских лимфоцитов после рождения (Henneke *et al.*, 2021). Поскольку В-клетки созревают именно в селезенке, то эти данные позволяют считать скорость дифференцировки В-клеток пониженной. Исследование Т-клеточной популяции лимфоцитов показало увеличение их содержания в селезенке к концу первой недели жизни. У новорожденных были выявлены и двойные позитивные Т-клетки, и Т-хелперы, и Т-цитотоксические лимфоциты, причем последние явно преобладали среди CD3-положительных клеток. Двойные позитивные Т-лимфоциты являются уменьшающейся в процессе развития субпопуляцией за счет увеличения доли дифференцированных Т-клеток, но постоянно обнаруживаются в селезенке и, соответственно, периферической крови половозрелых крыс (Trama *et al.*, 2012). В нашем исследовании их высокая относительная численность среди Т-клеток была обусловлена низким содержанием последних в селезенке. Результаты исследования показали, что увеличение численности Т-клеток к концу 1-й недели жизни было обусловлено в основном усилением миграции Т-хелперов в селезенку, что свидетельствует об активации дифференцировки именно этой субпопуляции Т-лимфоцитов в тимусе в первую неделю постнатального развития. Известно, что первая волна тимопоэза начинается на 15–20 сутки внутриутробного развития, что обуславливает появление единичных, в том числе дифференцирующихся, Т-клеток в периферических лимфоидных органах, затем, на вторые сутки постнатального периода, начинается процесс выселения, который в течение последующих нескольких суток обеспечивает периферическую экспансию Т-клеток (Klein, Norejsi,

1997). У крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ, этот процесс был менее выражен, что указывает на меньшую миграцию тимоцитов в селезенку. Морфометрическое исследование Т-зависимой зоны ПАЛМ показало, что ее большие размеры обусловлены пониженной плотностью расположения лимфоцитов. Анализ субпопуляций Т-клеток показал отсутствие различий в содержании Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов, а также двойных позитивных Т-лимфоцитов у новорожденных. Но к 7-м суткам были выявлены явные изменения, связанные с замедлением дифференцировки Т-цитотоксических лимфоцитов из двойных позитивных тимоцитов в тимусе и ускоренной миграцией последних в селезенку.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Воздействие низких доз эндокринного дисраптора ДДТ на развивающийся организм изменяет морфогенез селезенки в неонатальном периоде, обуславливая более интенсивное формирование периартериальных лимфоидных муфт и одновременно снижая дифференцировку В-лимфоцитов в ней. В конце первой недели постнатального развития наряду с нормальным содержанием Т-хелперов в селезенке наблюдается уменьшение численности Т-цитотоксических лимфоцитов, что свидетельствует о снижении их дифференцировки. Меньшее содержание нейтрофилов в маргинальной зоне также указывает на замедленные темпы функционального развития лимфоидных образований, в отличие от морфологического, у крыс, развивавшихся при воздействии низких доз ДДТ.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по гранту РФ № 23-25-00012.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Протокол локальной этической комиссии № 28(4) от 27 октября 2021 г.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Кудрявцева А. Д., Шелепчиков А. А., Мир-Кадыева Е. Я., Бродский Е. С. Изменение профиля полихлорированных дибензо-п-диоксинов и дибензофуранов

- в процессе биоаккумуляции в яйцах кур на свободном выгуле // Изв. РАН. Сер. биол. 2023. № 1. С. 93–102.
- Самотруева М. А., Ясенявская А. Л., Цибизова А. А., Башкина О. А., Галимзянов Х. М., Тюренков И. Н.* Нейроиммуноэндокринология: современные представления о молекулярных механизмах // Иммунология. 2017. Т. 38. № 1. С. 49–59.
- Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции». СПб.: ГИОРД, 2015. 176 с.
- Яглова Н. В., Обернихин С. С., Богданова И. М.* Снижение противоопухолевого иммунитета у потомства как следствие активации иммунной системы материнского организма в ранние сроки беременности // Российский иммунологический журнал. 2012. Т. 6. № 4. С. 357–362.
- Apostol A. C., Jensen K. D. C., Beaudin A. E.* Training the fetal immune system through maternal inflammation — a layered hygiene hypothesis // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. Art. 123.
- Bhatia R., Shiau R., Petreas M., Weintraub J. M., Farhang L., Eskenazi B.* Organochlorine pesticides and male genital anomalies in the child health and development studies // *Environ. Health Perspect.* 2005. V. 113. № 2. P. 220–224.
- Carvalho L.A., Gerdes J.M., Strell C., Wallace G.R., Martins J.O.* Interplay between the endocrine system and immune cells // *Biomed. Res. Int.* 2015. V. 2015. Art. 986742.
- Cheng H. W., Onder L., Novkovic M., Sonesson C., Lütge M., Pikor N., Scandella E., Robinson M. D., Miyazaki J. I., Tersteegen A., Sorg U., Pfeffer K., Rüllicke T., Hehlhans T., Ludewig B.* Origin and differentiation trajectories of fibroblastic reticular cells in the splenic white pulp // *Nat. Commun.* 2019. V.10. № 1. Art. 1739.
- Cuvillier-Hot V., Lenoir A.* Invertebrates facing environmental contamination by endocrine disruptors: Novel evidences and recent insights // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2020. V. 504. Art. 110712.
- Dickerson S.M., Cunningham S.L., Patisaul H.B., Woller M.J., Gore A.C.* Endocrine disruption of brain sexual differentiation by developmental PCB exposure // 2011. *Endocrinology.* V. 152. P. 581–594.
- Dutta R., Mondal A. M., Arora V., Nag T. C., Das N.* Immunomodulatory effect of DDT (bis[4-chlorophenyl]-1, 1, 1-trichloroethane) on complement system and macrophages // *Toxicology.* 2008. V. 84. № 12. P.957–966.
- Elter E., Wagner M., Buchenauer L., Bauer M., Polte T.* Phthalate exposure during the prenatal and lactational period increases the susceptibility to rheumatoid arthritis in mice // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. Art. 550.
- Forte M., Mita L., Cobellis L., Merafina V., Specchio R., Rossi S., Mita D.G., Mosca L., Castaldi M.A., De Falco M., Laforgia V., Crispi S.* Triclosan and bisphenol A affect decidualization of human endometrial stromal cells // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2016. V. 422. P. 74–83.
- Georgountzou A., Papadopoulos N. G.* Postnatal innate immune development: from birth to adulthood // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. Art. 957.
- Gerber R., Smit N. J., Van Vuren J. H., Nakayama S. M., Yohannes Y. B., Ikenaka Y., Ishizuka M., Wepener V.* Bioaccumulation and human health risk assessment of DDT and other organochlorine pesticides in an apex aquatic predator from a premier conservation area // *Sci. Total Environ.* 2016. V. 550. P. 522–533.
- Guarnotta V., Amodei R., Frasca F., Aversa, A., Giordano C.* Impact of chemical endocrine disruptors and hormone modulators on the endocrine system // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. 5710
- Haley P.* The lymphoid system: a review of species differences. *J. Toxicol. Pathol.* 2017. V. 30. P. 111–123.
- Henneke P., Kierdorf K., Hall L. J., Sperandio M., Horney M.* Perinatal development of innate immune toponology // *Elife.* 2021. V. 10. e67793.
- Holladay S.D., Smialowicz R.J.* Development of the murine and human immune system: differential effects of immunotoxicants depend on time of exposure // *Environ. Health Perspect.* 2000. V. 108. Suppl 3. P. 463–473.
- Huang Y., Li W., Qin L., Xie X., Gao B., Sun J., Li A.* Distribution of endocrine disrupting chemicals in colloidal and soluble phases in municipal secondary effluents and their removal by different advanced treatment processes // *Chemosphere.* 2019. V. 219, P. 730–739.
- Klein J., Horejsi V.* Immunology, 2nd edn. Oxford: Blackwell Science, 1997. 772p.
- Kraal G., Mebius R.* New insights into the cell biology of the marginal zone of the spleen // *Int. Rev. Cytol.* 2006. V. 250. P. 175–215.
- La Merrill M.A., Vandenberg L.N., Smith M.T., Goodson W., Browne P., Patisaul H.B., Guyton K.Z., Kortenkamp A., Cogliano V.J., Woodruff T.J., Rieswijk L., Sone H., Korach K.S., Gore A.C., Zeise L., Zoeller R.T.* Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2020. V. 18. P. 45–57.
- LaPlante C.D., Bansal R., Dunphy K.A., Jerry D.J., Vandenberg L.N.* Oxybenzone alters mammary gland morphology in mice exposed during pregnancy and lactation // *J. Endocr. Soc.* 2018. № 2. P. 903–921.
- Losco P.* Normal development, growth, and aging of the spleen // *Pathobiology of the aging rat.* V. 1 / Eds Mohr U., Dungworth D.L., Capen C.C. Washington: ILSI Press, 1992. P. 75–94.
- Mansouri A., Cregut M., Abbes C., Durand M.-J., Landoulsi A., Thouand G.* The environmental issues of DDT pollution and bioremediation: a multidisciplinary review // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2017. V. 181. P. 309–339.
- Martyniuk C.J., Mehinto A. C., Denslow N. D.* Organochlorine pesticides: Agrochemicals with potent endocrine-disrupting properties in fish // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2020. V. 507. Art. 110764.
- Massberg S., Schaerli P., Knezevic-Maramica I., Kollnberger M., Tubo N., Moseman E. A., Huff I. V., Junt T., Wagers A. J., Mazo I. B., von Andrian U. H.* Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues // *Cell.* 2007. V. 131. P. 994–1008.

- McGrath K.E., Frame J.M., Fegan K.H., Bowen J.R., Conway S.J., Catherman S.C., Kingsley P.D., Koniski A.D., Palis J. Distinct sources of hematopoietic progenitors emerge before HSCs and provide functional blood cells in the mammalian embryo // *Cell Reports*. 2015. V. 11. P. 1892–1904.
- Moraes-Pinto M.I., Suano-Souza F., Aranda C.S. Immune system: development and acquisition of immunological competence // *J. Pediatr. (Rio J)*. 2021. V. 97. Suppl. 1 P. S59–S66.
- Puga I., Cols M., Barra C.M., He B., Cassis L., Gentile M., Comerma L., Chorny A., Shan M., Xu W., Magri G., Knowles D.M., Tam W., Chiu A., Busnel J.B., Serrano S., Lorente J.A., Bellosillo B., Lloreta J., Juanpere N., Alameda F., Baró T., de Heredia C.D., Torán N., Català A., Torrebadell M., Fortuny C., Cusí V., Carreras C., Diaz G.A., Blander J.M., Farber C.M., Silvestri G., Cunningham-Rundles C., Calvillo M., Dufour C., Notarangelo L.D., Lougaris V., Plebani A., Casanova J.L., Ganai S.C., Diefenbach A., Aróstegui J.I., Juan M., Yague J., Mahlaoui N., Donadieu J., Chen K., Cerutti A. B cell–helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen // *Nat. Immunol.* 2011. V. 13 P. 170–180.
- Simon A.K., Hollander G.A., McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age // *Proc. Biol. Sci.* 2015. V. 282. Art. 20143085.
- Spaan K., Haigis A.C., Weiss J., Legradi J. Effects of 25 thyroid hormone disruptors on zebrafish embryos: A literature review of potential biomarkers // *Sci. Total Environ.* 2019. V. 656. P. 1238–1249.
- Street M.E., Angelini S., Bernasconi S., Burgio E., Cassio A., Catellani C., Cirillo F., Deodati A., Fabbri E., Fanos V., Gargano G., Grossi E., Lughetti L., Lazzeroni P., Mantovani A., Migliore L., Palanza P., Panzica G., Papi A.M., Parmigiani S., Predieri B., Sartori C., Tridenti G., Amarri S. Current knowledge on endocrine disrupting chemicals (EDCs) from animal biology to humans, from pregnancy to adulthood: highlights from a national Italian meeting // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. Art. 1647.
- Takeya M., Takahashi K. Ontogenic development of macrophage subpopulations and Ia–positive dendritic cells in fetal and neonatal rat spleen // *J. Leukoc. Biol.* 1992. V. 52. P. 516–523.
- Tebourbi O., Rhouma K.B., Sakly M. DDT induces apoptosis in rat thymocytes // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1998. V. 61. P. 216–223.
- Trama A.M., Holzkecht Z.E., Thomas A.D., Su K.Y., Lee S.M., Foltz E.E., Perkins S.E., Lin S.S., Parker W. Lymphocyte phenotypes in wild-caught rats suggest potential mechanisms underlying increased immune sensitivity in post-industrial environments // *Cell. Mol. Immunol.* 2012. V. 9. № 2. P. 163–174.
- Tsomartova D.A., Yaglova N.V., Yaglov V.V. Changes in Canonical  $\beta$ -Catenin/Wnt Signaling Activation in the Adrenal Cortex of Rats Exposed to Endocrine Disruptor Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) during Prenatal and Postnatal Ontogeny // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018. V. 164. № 4. P. 493–496.
- Udoji F., Martin T., Etherton R., Whalen M.M. Immunosuppressive effects of triclosan, nonylphenol, and DDT on human natural killer cells in vitro // *J. Immunotoxicol.* 2010. V. 7. № 3. P. 205–212.
- World Health Organization. Pesticide residues in food — 2018. Toxicological evaluations. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations. WHO: Geneva, Switzerland, 2019. 780 p.
- Xu C., Yin S., Tang M., Liu K., Yang F., Liu W. Environmental exposure to DDT and its metabolites in cord serum: Distribution, enantiomeric patterns, and effects on infant birth outcomes // *Sci. Total Environ.* 2017. V. 580. P. 491–498.
- Yaglova N.V., Nazimova S.V., Obernikhin S.S., Tsomartova D.A., Yaglov V.V., Timokhina E.P., Tsomartova E.S., Cheresheva E.V., Ivanova M.Y., Lomanovskaya T.A. Developmental exposure to DDT disrupts transcriptional regulation of postnatal growth and cell renewal of adrenal medulla // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 3. Art. 2774.
- Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Tsomartova D.A., Nazimova S.V., Yaglov V.V., Tsomartova E.S., Cheresheva E.V., Ivanova M.Y., Lomanovskaya T.A. Impaired morphogenesis and function of rat adrenal zona glomerulosa by developmental low-dose exposure to DDT is associated with altered Oct4 expression // *Int. J. Mol. Sci.* 2021a. V. 22. № 12. Art. 6324.
- Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V., Nazimova S.V., Timokhina E.P., Tsomartova D.A. Low-dose exposure to endocrine disruptor dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) affects transcriptional regulation of adrenal zona reticularis in male rats // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2021b. V. 170. № 5. P. 682–685.
- Yaglova N.V., Timokhina E.P., Yaglov V.V. Effects of low-dose dichlorodiphenyltrichloroethane on the morphology and function of rat thymus // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013. V. 155. № 5. P. 701–704.
- Yamazaki H., Takano R., Shimizu M., Muruayama N., Kitajima M., Shono F. Human blood concentrations of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) extrapolated from metabolism in rats and humans and physiologically based pharmacokinetic modeling // *J. Health Sci.* 2010. V. 56. № 5. P. 566–575.
- Yu K., Zhang X., Tan X., Ji M., Chen Y., Wan Z., Yu Z. Multigenerational and transgenerational effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on ovarian reserve and follicular development through AMH/AMHR2 pathway in adult female rats // *Food Chem. Toxicol.* 2020. V. 140. Art. 111309.

## **Spleen Morphogenesis during the Neonatal Period in Rats Exposed to Endocrine Disruptor DDT**

© 2024 N. V. Yaglova<sup>#</sup>, B. B. Gagulaeva, S. S. Obernikhin, E. P. Timokhina, V. V. Yaglov

*Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution  
“Petrovsky National Research Centre of Surgery”, Abrikosovskiy per, 2, Moscow, 119991 Russia  
#E-mail: yaglova@mail.ru*

Spleen morphogenesis during the neonatal period in rats exposed in prenatal and postnatal development to low doses of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), a persistent universal pollutant with endocrine disrupting properties, was studied. More intensive formation of periarterial lymphoid sheaths and marginal zone and simultaneously decreased rate of B-cell differentiation in the spleen were revealed. A higher content of differentiating T-cells and a lower number of cytotoxic T-lymphocytes by the end of the first week of life indicates a decrease in the differentiation of the latter. A lower content of neutrophils in the marginal zone also indicates a delay in the rate of functional development of lymphoid tissue, as opposed to morphological, in rats developing under exposure to low doses of DDT.

*Key words:* spleen, morphogenesis, lymphopoiesis, hematopoiesis, endocrine disruptor, DDT.

## ФЕНОЛОГИЧЕСКИЙ ОТКЛИК РАСТЕНИЙ РАЗЛИЧНЫХ БИОМОРФ НА ИЗМЕНЕНИЕ КЛИМАТА В ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

© 2024 г. Э. С. Фомин\*, Т. И. Фомина\*\*, @

\*Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики СО РАН”,  
пр. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

\*\*Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, ул. Золотодолинская, 101, Новосибирск, 630090 Россия

@E-mail: fomina-ti@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.05.2023

После доработки 22.08.2023

Принята к публикации 22.08.2023

Приведены результаты 20-летнего исследования (1996–2015 гг.) фенологии 78 видов многолетних растений, относящихся к биоморфологическим группам хамефитов, гемикриптофитов и геофитов. На фоне рассчитанных линейных трендов температур воздуха и осадков за теплый сезон года в Новосибирске проанализировано смещение времени фенологических событий. Полученные тренды для групп видов разнонаправленны и значительно варьируют по величине. При этом большая часть смещений фенологии обусловлена не трендами, а межгодовой изменчивостью климатических показателей.

*Ключевые слова:* метеотренды, фенологические тренды, хамефиты, гемикриптофиты, геофиты, Западная Сибирь.

DOI: 10.31857/S1026347024030031, EDN: VAYSBX

В современных условиях существенно возрос интерес к фенологии растений как одному из надежных биоиндикаторов глобального изменения климата (Reñuelas *et al.*, 2009; Lippmann *et al.*, 2019). Многочисленные исследования последних десятилетий в умеренных экосистемах Северного полушария показывают продвижения в весенней фенологии растений и задержки осенних событий, при этом выявленные фенологические тренды в целом соответствуют паттернам изменения температуры (Walther *et al.*, 2002; Menzel *et al.*, 2006; Cleland *et al.*, 2007). Установлена высокая вариабельность смещений фенологии в зависимости от региона, видового состава, а также от длины временного ряда, дат его начала и окончания, которые имеют решающее значение для выявления тенденций (Sparks, Menzel, 2002; Bertin, 2008; Piao *et al.*, 2019). Даже в пределах одного местообитания растения проявляют контрастные реакции на долгосрочное изменение климата и его межгодовые флуктуации, обусловленные неодинаковой чувствительностью фенологических явлений и видов (Miller-Rushing *et al.*, 2008; Gordo, Sanz, 2010; Lehoczky *et al.*, 2016; Chmura *et al.*, 2019).

Поскольку фенологические признаки служат одним из проявлений жизненной формы (*growth form*), ряд авторов исследовали корреляции фенологических смещений с биоморфологическими особенностями видов. По данным Рут с соавт. (Root *et al.*, 2003), в умеренных и бореальных широтах весенняя

фенология травянистых растений более чувствительна к изменению климата, чем древесных. Аналогичные результаты получены для цветения, независимо от его сроков в течение сезона (Mo *et al.*, 2017). Однако в других работах показана противоположная тенденция изменения фенологии: деревья, кустарники и кустарнички в среднем опережают травы по интенсивности смещений фенофаз (Ge *et al.*, 2015; Rosbakh *et al.*, 2021; Kubov *et al.*, 2022). Полагают, что воздействие весеннего потепления или осеннего похолодания на травянистые растения смягчается снежным покровом, почвой и окружающей растительностью, тогда как деревья и кустарники, расположенные в воздушной среде, испытывают более сильное, непосредственное воздействие температур и инсоляции. Это косвенно подтверждается результатами двух метаанализов, в одном из которых изменение весенней фенологии не доказано у 68 % видов трав (Parmesan, Yohe, 2003), а в другом — у 59 % (Khanduri *et al.*, 2008), тогда как доля фенологически нечувствительных древесных видов составила всего 18 % и 14 % соответственно.

Имеющиеся данные касаются крупных подразделений жизненных форм, таких как древесные и травянистые растения. Немногие авторы при анализе смещений фенологии среди древесных выделяют вечнозеленые и листопадные виды, а среди травянистых — граминоиды и разнотравье (Iversen *et al.*, 2009; König *et al.*, 2018). Представляет интерес выявление

фенологических реакций в более мелких подразделениях биоморф, объединяющих функционально более близкие виды. К тому же крайне мало исследований и обобщений фенологических данных проведено *ex situ*. В последнее время акцентируется значение региональных работ, выполненных на многих видах, для выявления закономерностей смещений фенологии в связи с динамикой местного климата (Robbirt *et al.*, 2011; Berend *et al.*, 2019; Primack *et al.*, 2021). Полагают, что преимущественно фенотипическая пластичность функциональных признаков, включая сроки фенологического развития, обеспечивает адаптацию растений на фоне прогрессирующего изменения климата (Franks *et al.*, 2014; Gratani, 2014).

Настоящая работа является продолжением исследования фенологии многолетних растений в условиях лесостепи Западной Сибири. Ранее нами (Фомин, Фомина, 2021) изучались реакции различных феноритмотипов. Цель данного исследования состояла в оценке фенологических смещений у видов различных биоморф в связи с тенденцией изменения климата Новосибирска.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Объекты и методики исследования.* В коллекции декоративных растений природной флоры Центрального сибирского ботанического сада (ЦСБС СО РАН) изучали фенологию и жизненные формы 78 видов многолетников. Сбор данных осуществляли

в период 1996—2015 гг. Фенонаблюдения проводили регулярно, 2—3 раза в неделю, в течение всего сезона вегетации, используя методику для травянистых многолетних растений И. Н. Бейдеман (1974). Жизненные формы видов описывали в конце вегетационного периода у особей зрелого генеративного состояния с применением классических подходов биоморфологии растений (Raunkiaer, 1934; Серебряков, 1964). Многолетники произрастали на делянках 1—3 м<sup>2</sup>, соответственно, число особей разных видов было неодинаковым и различалось по годам, но не менее 4—6 шт. каждого вида на момент наблюдения. Поскольку немаловажной задачей было поддержание декоративного состояния коллекции, нами проводились своевременные мероприятия по пересадке и делению растений, не допускающие перехода в старое генеративное состояние. Поэтому наблюдения охватывали особи зрелого генеративного состояния, а при наличии самосева у некоторых видов (*Allium ramosum*, *Hyssopus officinalis*, *Linum perenne*) — также молодые генеративные.

По классификации С. R. Raunkiaer (1934), исследованные виды составили биоморфологические группы хамефитов (12), гемикриптофитов (43) и геофитов (23) (табл. 1). Среди них *Hyssopus officinalis*, *Satureja montana* и *Thymus mongolicus* — полукустарнички, остальные виды принадлежат к травянистым поликарпикам (Фомина, 2012). Для характеристики климатических показателей за период исследования использовали данные по метеостанции Огурцово (№ 29638, <https://rp5.ru/> Архив\_погоды\_в\_Огурцово).

**Таблица 1.** Распределение исследованных видов по биоморфологическим группам

Хамефиты
<i>Aizopsis hybrida</i> (L.) Grulich, <i>Bergenia crassifolia</i> (L.) Fritsch, <i>Eremogone saxatilis</i> (L.) Ikonn., <i>Hyssopus officinalis</i> L., <i>Hylotelephium ewersii</i> (Ledeb.) H. Ohba, <i>Phlox subulata</i> L., <i>Satureja montana</i> L., <i>Sedum album</i> L., <i>S. reflexum</i> L., <i>S. spurium</i> Bieb., <i>Thymus mongolicus</i> (Ronn.) Ronn., <i>Veronica incana</i> L.
Гемикриптофиты
<i>Achillea millefolium</i> L., <i>Aizopsis aizoon</i> (L.) Grulich, <i>Anaphalis margaritacea</i> (L.) A. Gray, <i>Aquilegia sibirica</i> Lam., <i>Aster tataricus</i> L.fil., <i>Bistorta major</i> S. F. Gray, <i>Brunnera sibirica</i> Stev., <i>Campanula alliariifolia</i> Willd., <i>C. persicifolia</i> L., <i>C. rapunculoides</i> L., <i>C. trachelium</i> L., <i>Centaurea dealbata</i> Willd., <i>Clematis recta</i> L., <i>Coreopsis grandiflora</i> Hogg, <i>Dianthus versicolor</i> Fisch. ex Link, <i>Dracocephalum grandiflorum</i> L., <i>D. ruyschiana</i> L., <i>Filipendula palmata</i> (Pall.) Maxim., <i>F. rubra</i> (Hill) Rob., <i>F. ulmaria</i> (L.) Maxim., <i>F. vulgaris</i> Moench, <i>Gentiana macrophylla</i> Pall., <i>Geranium pratense</i> L., <i>G. sanguineum</i> L., <i>Heliopsis scabra</i> Dun., <i>Heuchera sanguinea</i> Engelm., <i>Lavatera thuringiaca</i> L., <i>Leontopodium leontopodioides</i> (Willd.) Beauv., <i>Lychnis chalconica</i> L., <i>Lysimachia punctata</i> L., <i>L. vulgaris</i> L., <i>Lythrum salicaria</i> L., <i>Mentha longifolia</i> (L.) Huds., <i>Monarda didyma</i> L., <i>M. fistulosa</i> L., <i>Nepeta sibirica</i> L., <i>Physostegia virginiana</i> (L.) Benth., <i>Polemonium caeruleum</i> L., <i>Primula macrocalyx</i> Bunge, <i>Rheum rhabarbarum</i> L., <i>Thalictrum aquilegifolium</i> L., <i>V. cucullata</i> Ait., <i>Viola hirta</i> L.
Геофиты
<i>Aconitum kusnezoffii</i> Reichenb., <i>Adonis vernalis</i> L., <i>Allium aflatunense</i> B. Fedtsch., <i>A. microdictyon</i> Prokh., <i>A. obliquum</i> L., <i>A. ramosum</i> L., <i>A. schoenoprasum</i> L., <i>A. senescens</i> L. ssp. <i>glaucum</i> (Schrud.) Friesen, <i>Anemonidium canadense</i> (L.) A. Löve & D. Löve, <i>A. dichotomum</i> (L.) Holub, <i>Anemonioides altaica</i> (C. A. Mey.) Holub, <i>Asparagus officinalis</i> L., <i>Convallaria majalis</i> L., <i>Corydalis bracteata</i> (Steph.) Pers., <i>Erythronium sibiricum</i> (Fisch. et C. A. Mey.) Kryl., <i>Hemerocallis minor</i> Mill., <i>Lilium pensylvanicum</i> Ker.-Gawl., <i>L. pilosiusculum</i> (Freyn) Misch., <i>L. pumilum</i> Delile, <i>Paeonia lactiflora</i> Pall., <i>Platycodon grandiflorus</i> (Jacq.) A. DC., <i>Polygonatum odoratum</i> (Mill.) Druce, <i>Thalictrum flavum</i> L.

*Статистическая обработка результатов.* Данные метеорологических и фенологических наблюдений обрабатывали стандартными методами с помощью пакета MS Excel и собственных программ, написанных на языке программирования C++. За период исследования вычислены метеорологические тренды температуры воздуха  $T$  и количества осадков  $R$  теплого сезона года. Использовали метод построения линейных трендов на каждую дату с 1 апреля по 31 октября с последующим вычислением простого скользящего среднего в окне шириной 30 суток с целью сглаживания краткосрочных флуктуаций и выявления основных изменений. Далее рассчитывали тренды фенологических событий для отдельных видов и биоморфологических групп.

Для построения трендов и оценки их достоверности применяли бутстреп (Efron, 1979; Singh, 1981). Нами проанализированы даты фенологических событий за 20-летний период и их смещения, обусловленные линейными трендами за тот же период времени. Поскольку большая часть анализируемых распределений признаков не является нормальной, для представления данных вместо средних арифметических значений со среднеквадратическим отклонением использовали медианные значения ( $Me$ ) с доверительным интервалом  $\sigma_{68,2}$ , который включает 68.2 % наиболее вероятных событий. Расчет корреляций производили с использованием линейного коэффициента Пирсона  $r$ . Для интерпретации величины корреляции применяли шкалу, в которой границы категорий смещены в сторону низких значений:  $|r| \leq 0.1$  — слабая;  $0.1 < |r| < 0.3$  — средняя и  $|r| \geq 0.3$  — высокая, при этом малое значение  $r$  необязательно означает малые последствия (Котеров и др., 2019). Такой подход оправдан для анализа фенологических реакций растений, проявляющих высокую инерционность в ответ на непрерывные, разномасштабные и разнонаправленные изменения погодных условий. В качестве уровня значимости принято  $\alpha = 0.05$ .

*Климатические условия пункта исследования.* Город Новосибирск (55°2'29.4" N, 82°56'4.6" E) расположен в юго-восточной части Западно-Сибирской равнины (Приобское плато), в лесостепной зоне, на стыке подзон гемибореальных лесов и северной лесостепи. Климат местности континентальный, умеренно-холодный с недостаточным увлажнением. Средние температуры зимних месяцев равны  $-15...-18^\circ\text{C}$ , летних  $16...19^\circ\text{C}$ . Безморозный период длится 96—146 дней. Среднегодовое количество осадков равно 440 мм, из них в теплый сезон выпадает 320 мм. Среднегодовое значение продолжительности солнечного сияния составляет 2088 часов. Тенденция потепления климата в Новосибирске за последние полвека проявилась ростом среднегодовой температуры воздуха на  $0.27^\circ\text{C}$  за десятилетие, в основном за счет переходных сезонов, а температурный фон летних месяцев остается практически постоянным. Изменился режим увлажнения:

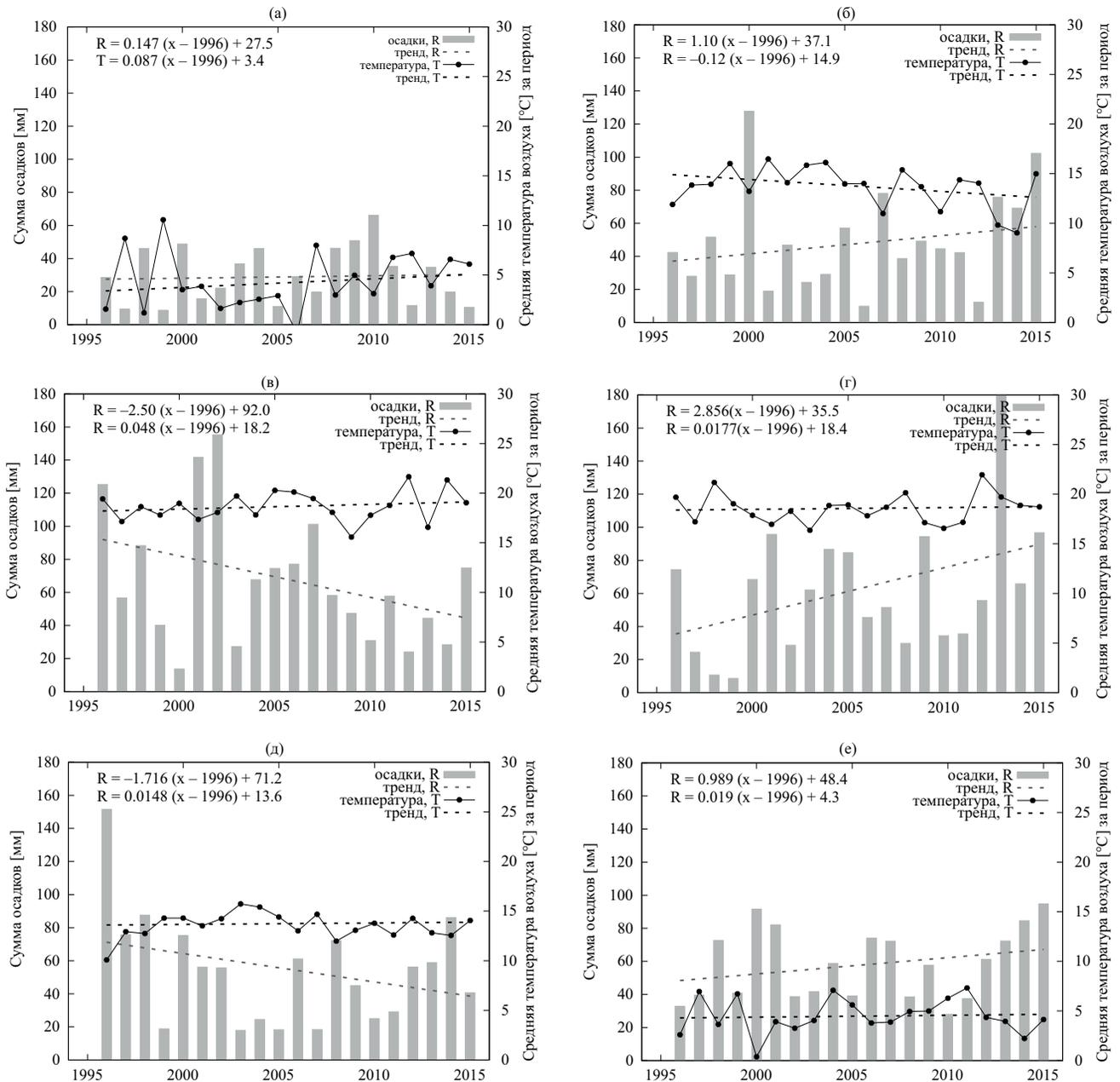
в теплый сезон года количество осадков сократилось на 11 мм, тогда как высота снежного покрова увеличивалась на 4 см за десятилетие и период его устойчивого залегания удлинился почти на две декады. Характерной чертой текущего изменения климата в Новосибирске является увеличение амплитуды межгодовой изменчивости климатических показателей, при общей тенденции потепления отмечаются циклические колебания метеоусловий в сторону похолодания (Воронина, Гриценко, 2011; Лучицкая и др., 2014).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Метеорологические тренды.* Теплый сезон года (апрель—октябрь) за период исследования характеризовался высокой изменчивостью по условиям увлажнения ( $V = 32\%$ ). Наиболее засушливым выдался сезон 1999 г. (101 мм), по сравнению с которым в самые влажные сезоны 1996 и 2013 гг. осадков выпало более, чем в 4 раза. Среднее значение за период составило  $271 \pm 19$  мм, что на 15 % меньше климатической нормы. Температурный фон отличался несущественными колебаниями ( $V = 6.3\%$ ) с минимальным значением  $12.1^\circ\text{C}$  для 1996 и 2013 гг. и максимальными — для 1999 г. ( $14.9^\circ\text{C}$ ) и 2012 г. ( $15.3^\circ\text{C}$ ) при средней величине показателя  $13.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . Тренды климатических параметров теплого сезона за 20-летний период незначительны: средняя температура воздуха повысилась на  $0.16^\circ\text{C}$ , а количество осадков практически не изменилось ( $-0.01$  мм).

Нами обнаружены существенные внутрисезонные тренды метеоусловий (суммы температур и количества осадков), в соответствии с которыми выделены фенологические субсезоны на основе работы Г. Э. Шульца (1981) (рис. 1). Ранней весной заметно потеплело ( $+39.6^\circ\text{C}$ ), тогда как зеленая весна стала более влажной и значительно более холодной ( $-63.1^\circ\text{C}$ ;  $+16.6$  мм). В перволетье возросла вероятность жаркой и сухой погоды ( $+32.7^\circ\text{C}$ ;  $-40.7$  мм), но в разгар лета количество осадков заметно увеличилось ( $+33.7$  мм). В первоосень сложились условия относительного тепла и сухости ( $+28.7^\circ\text{C}$ ;  $-14.4$  мм), а в субсезон золотой осени при тех же значениях температур повысилось увлажнение ( $+15.9$  мм). Продолжительность вегетационного периода со среднесуточными температурами воздуха выше  $5^\circ\text{C}$  достоверно увеличилась на 12 дней, периода с активными температурами выше  $10^\circ\text{C}$  — на 8 дней. При этом безморозный период сократился на 5 дней за счет смещения даты последнего весеннего заморозка (из-за похолодания в мае). Сход снежного покрова отмечался 12 апреля, с задержкой на 4 дня, при той же среднегодовомой дате установления — 1 ноября.

*Фенологические тренды.* Вычисление трендов  $\Delta\eta$  производили путем построения линейной



**Рис. 1.** Тренды метеорологических показателей субсезонов теплого периода года в Новосибирске: а — ранняя весна (1 апреля — 5 мая); б — зеленая весна (6 мая-10 июня); в — первоцветье (11 июня — 15 июля); г — полное лето (16 июля — 15 августа); д — первоосень (16 августа — 20 сентября); е — золотая осень (21 сентября — 31 октября).

регрессии  $\eta$  (год) =  $\alpha + \beta$  (год — 1996), где  $\eta$  — дата наступления фенофазы или ее продолжительность;  $\alpha$  — значение  $\eta$  в 1996 году,  $\beta$  — скорость изменения  $\eta$ . В таблицах 2 и 3 приведены результаты статистического анализа смещения дат фенологических событий (фенофаз и межфазных периодов) по биоморфологическим группам видов. Обработка данных на уровне групп за счет значительного увеличения объема выборок, до нескольких тысяч записей, позволяет повысить точность и достоверность полученных трендов. Виды каждой

группы в процентном выражении распределились на поддерживающие тренд  $N^+$  и отклоняющиеся в противоположную сторону  $N^-$  ( $p_v \leq \alpha$ ), при этом разность  $100 - N^+ - N^-$  представляет долю видов, индифферентных к изменению климата.

**Корреляции фенофаз с метеоусловиями.** Рис. 2 демонстрирует зависимость средних дат начала вегетации в группах от погодных условий весны — даты схода снежного покрова и сумм температур воздуха выше 5°C, а также средних дат начала цветения от сумм температур воздуха выше 10°C. Корреляции

Таблица 2. Тренды вегетации биоморфологических групп

Группа	$Me\{\sigma_{68,2}\}$	$\Delta L\{\sigma_{68,2}\}$	$R^2$	$N^-$	$N^+$
Начало вегетации					
Хамефиты	27.04 {-6, 7}	4{-2, 3}	0.08	10	51
Гемикриптофиты	03.05 {-6, 7}	4{-5, 5}	0.11	21	60
Геофиты	03.05 {-5, 6}	3{-4, 5}	0.09	22	51
Конец вегетации					
Хамефиты	29.10 {-10, 10}	-3{-2, 3}	0.07	11	46
Гемикриптофиты	20.10{-10, 9}	-1{-5, 7}	0.07	36	42
Геофиты	16.09 {-9, 8}	2{-5, 5}	0.17	28	46
Период вегетации, дни					
Хамефиты	180 {-10, 12}	-8{-7, 5}	0.08	10	55
Гемикриптофиты	172 {-10, 10}	-6{-7, 11}	0.13	31	52
Геофиты	140 {-9, 9}	~ 0{-10, 7}	0.26	32	41

Примечание.  $Me\{\sigma_{68,2}\}$  — медианное значение дат фенофаз с доверительным интервалом;  $\Delta L\{\sigma_{68,2}\}$  — медианное значение смещения дат в днях, при этом отрицательное значение означает более раннее наступление фенофазы или сокращение межфазного периода, а положительное — более позднее наступление фенофазы или удлинение межфазного периода;  $R^2$  — коэффициент детерминации тренда;  $N^-$  — процент видов группы, не поддерживающих тренд ( $p_v \leq \alpha$ ),  $N^+$  — процент видов группы, поддерживающих тренд ( $p_v \leq \alpha$ ).

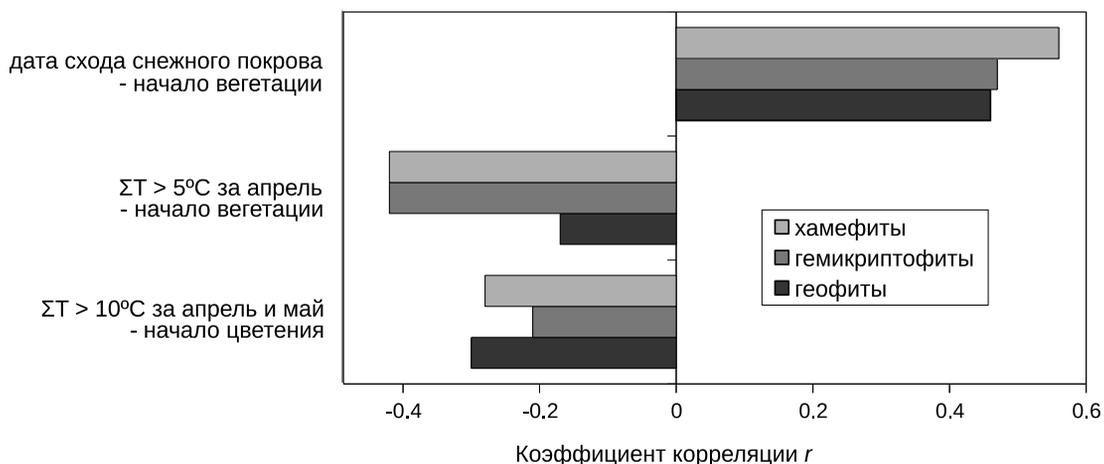
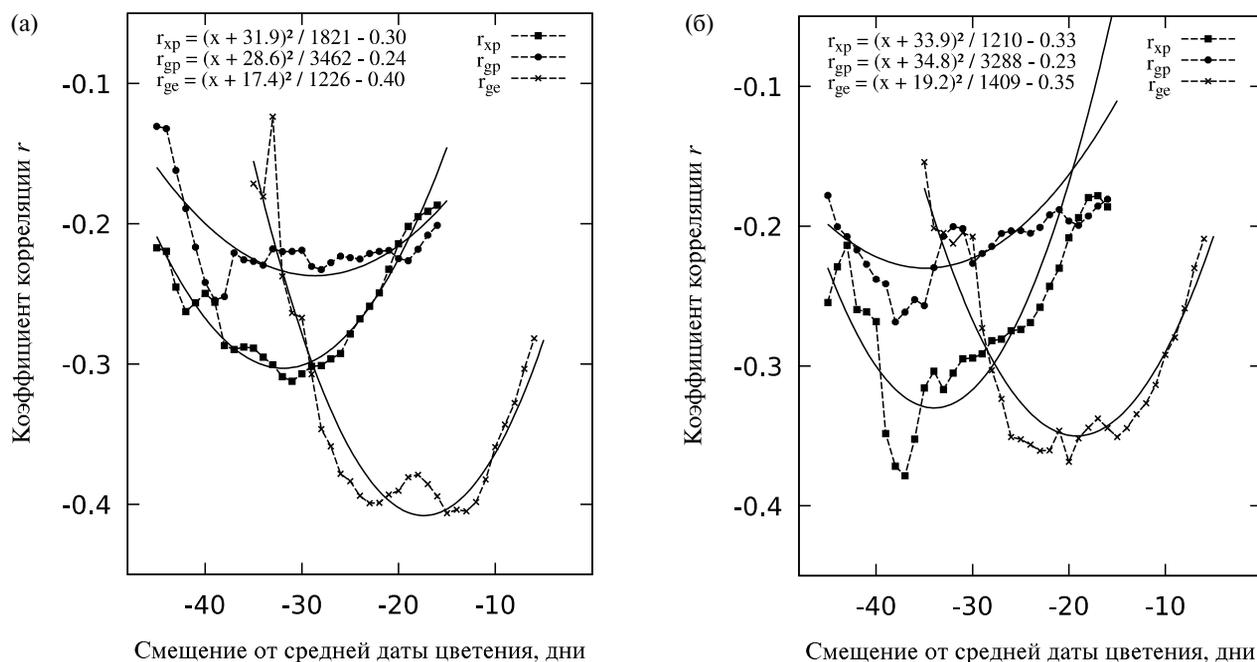


Рис. 2. Корреляции фенофаз начала вегетации и начала цветения в группах многолетников с погодными условиями весны.

со снеготаянием высокие и положительные, т. е. более длительное сохранение снежного покрова задерживает вегетативную фазу. Напротив, корреляции с температурными условиями отрицательные и наиболее высокие в начале сезона: накопление тепла стимулирует рост, особенно у хамефитов и гемикриптофитов, но при переходе к репродуктивной фазе эта зависимость ослабевает.

Мы также рассчитали корреляции средних дат начала цветения по группам с суммами температур воздуха выше 5°C и выше 10°C на разных

промежутках от времени наступления фенофазы, определив таким образом продолжительность предшествующих периодов с максимальным влиянием температур на начало цветения (рис. 3). Для пар значений смещение — коэффициент корреляции построены квадратичные регрессионные кривые по группам видов. Уравнения позволяют вычислить позицию и значение минимума каждой кривой:  $R = (x - x_{\min})^2 / c + y_{\min}$ , где коэффициенты  $x_{\min}$  и  $y_{\min}$  указывают на координаты минимума кривой.



**Рис. 3.** Корреляции средних дат начала цветения в группах многолетников с суммами температур воздуха предшествующего периода: а — выше 5°C, б — выше 10°C. Обозначения: *xp* — хамефиты, *gp* — гемикриптофиты, *ge* — геифиты. Сплошные линии — квадратичные регрессионные кривые.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В исследованиях по влиянию изменения климата на фенологию растений в умеренном поясе Северного полушария показана высокая чувствительность весенних фенологических событий, таких как распускание почек, разворачивание листьев, начало цветения к потеплению в конце зимы и ранней весной (Sparks, Menzel, 2002; Cleland *et al.*, 2007; Gordo, Sanz, 2010). У многолетников фенофаза начала вегетации в лесостепи Западной Сибири приходится на субсезон ранняя весна и для зимнезеленых видов означает возобновление фотосинтеза перезимовавших листьев, а для остальных видов — отрастание побегов. Начало вегетации коррелирует с температурными условиями и датой снеготаяния, которая зависит, в свою очередь, от количества накопленного тепла и высоты снежного покрова (рис. 2).

В исследуемый период рост снежного покрова составил около 8 см, достигнув 43 см (Лучицкая и др., 2014), а период его залегания удлинился, по нашим данным, на 4 дня. Несмотря на заметное потепление в апреле, сдвиг снеготаяния на более поздние сроки оказался основным фактором, влияющим на весеннюю фенологию многолетников. Ранее показано (Yun *et al.*, 2018), что высокий снежный покров и длительное снегозалежание задерживают начало вегетации из-за снижения поглощения солнечной радиации и потребления большего тепла на таяние снега. Поэтому увеличение снегопадов зимой может обнулить

воздействие повышенных температур на весенние фенофазы растений (Bertin, 2008).

По нашим данным, высокие положительные корреляции ( $r = 0.46...0.56$ ) дат начала вегетации с датой схода снежного покрова означают, что сроки наступления фенофазы согласованы с направлением тренда во всех биоморфологических группах, при задержке на 3—4 дня в 2015 г. по сравнению с 1996 г. Корреляции средних дат начала вегетации с накопленными суммами активных температур отрицательные, но варьируют по величине. Менее зависимыми от температур воздуха оказались геифиты: это холодостойкие ранневесенние эфемероиды (*Anemonoides altaica*, *Corydalis bracteata*, *Erythronium sibiricum*) или луковичные и корневищные виды с хорошо защищенными от внешних условий почками возобновления. У гемикриптофитов и хамефитов вегетативный рост происходит с одинаковой интенсивностью при температурах выше 5°C ( $r = -0.42$ ), но у последних он возобновляется в среднем на 6 дней раньше (табл. 2). Анализ табл. 2 показывает, что тренд запаздывающего начала вегетации отмечался немногим более чем у половины многолетников, у 19—39 % видов даты начала вегетации не изменились, а для 10—22 % видов выявлено опережение.

По средним датам окончания вегетации установлена небольшая задержка для геифитов (+2 дня), небольшое опережение — для гемикриптофитов и хамефитов (−1 и −3 дня соответственно). При этом распределение видов в группах по направлению

смещений вегетативной фазы свидетельствует о том, что тренды осенних фенодат явно слабее весенних. Продолжительность вегетации у геофитов практически не изменилась, но сократилась значительно у гемикриптофитов (–6 дней) и хамефитов (–8 дней). Отчасти это обусловлено более поздним началом вегетации. Но в целом, как показали исследования, зависимость осенних фенофаз от внешних условий сложнее, чем весенне-летних (Menzel *et al.*, 2006; Ge *et al.*, 2015).

Один из механизмов сокращения периода вегетации заключается в том, что повышение сезонных температур усиливает поглощение углерода листьями и приводит к росту продуктивности, но из-за физиологических ограничений этот процесс вызывает более раннее старение листьев и сокращение продолжительности вегетации (Zani *et al.*, 2020). В случае травянистых многолетников смещение дат окончания вегетации имеет неоднородный характер. Действительно, у некоторых длительно вегетирующих гемикриптофитов с одной генерацией побегов в течение сезона (*Aizopsis aizoon*, *Anaphalis margaritacea*, *Lythrum salicaria*) период вегетации сократился на 4–9 дней, в то время как у других произошло его удлинение, например, у *Dracosephalum ruyschiana* — на 2 недели. Среди безрозеточных геофитов длительность вегетации также изменилась разнонаправленно, с увеличением до 15 дней у *Anemonidium dichotomum* и с уменьшением до 27 дней у *Adonis vernalis*.

Имеются данные, что повышение летних температур ускоряет окончание вегетации травянистых растений, а увеличение количества осадков его задерживает (Huang *et al.*, 2020). Наши расчеты показали, что даты окончания вегетации многолетников практически не зависят от суммы осадков в первоосень ( $r = -0.05 \dots -0.10$ ), но в предшествующий субсезон полное лето выявлены существенные отрицательные корреляции для гемикриптофитов ( $r = -0.25$ ) и хамефитов ( $r = -0.67$ ). Повышение влажности во второй половине лета привело к сокращению длительности вегетации этих групп многолетников (при этом зимнезеленые виды из расчетов были исключены). Большая разнородность смещений осенней фенологии, чем весенней, может быть обусловлена влиянием фотопериода или эндогенных факторов, механизмы которых недостаточно изучены (Карпиусова, 1985; Жмылев и др., 2001; Menzel *et al.*, 2020).

Примечательно, что в группе хамефитов процент видов, отклоняющихся от тренда по срокам начала, окончания и длительности вегетации, в 2–3 раза ниже, чем у гемикриптофитов и геофитов, а также самый высокий процент индифферентных видов. Вероятное объяснение состоит в том, что большинство хамефитов — растения, круглогодично сохраняющие зеленые листья, которые обеспечивают им более низкую фенологическую чувствительность. По некоторым данным (Aerts, 1995), благодаря наличию

тканей с высоким уровнем резистентности, как в долго живущих листьях, уменьшаются потери питательных веществ и тем самым снижается зависимость от климатических условий.

Фаза цветения большинства многолетников в Новосибирске приходится на субсезоны зеленая весна и первоцветье, поэтому нами вычислены корреляции дат начала цветения с суммами температур воздуха выше 10°C за апрель–май. Зависимость оказалась средней ( $r = -0.21 \dots -0.30$ ) для всех биоморфологических групп. Полагая, что на величину данной связи влияют разные сроки начала цветения видов, мы вычислили также корреляции дат начала цветения в группах с суммами активных температур воздуха за предшествующие периоды различной продолжительности (рис. 3). Это позволило установить временные промежутки до начала фазы цветения с максимальной зависимостью от суммы температур выше 5°C: 32 дня в среднем для хамефитов ( $r = -0.30$ ), 29 дней — для гемикриптофитов ( $r = -0.24$ ) и 17 дней — для геофитов ( $r = -0.40$ ). При суммах температур выше 10°C соответствующие периоды составили: 35 дней для гемикриптофитов ( $r = -0.23$ ), 34 дня — для хамефитов ( $r = -0.33$ ) и 19 дней — для геофитов ( $r = -0.35$ ). Таким образом, даты начала цветения отрицательно коррелируют с накопленными температурами, притом температурная чувствительность геофитов заметно выше.

Из данных табл. 3 следует, что среди признаков репродуктивной фенологии наиболее сильные отрицательные тренды показаны для длительности префлорального периода у хамефитов (–9 дней) и гемикриптофитов (–7 дней). Префлоральный период в этих группах существенно сократился, а продолжительность цветения, напротив, увеличилась на 3–4 дня, отчасти за счет более раннего начала цветения. У геофитов выявлены слабые отрицательные тренды длительности префлорального периода и периода цветения (–1 день) при небольшой задержке начала цветения (+2 дня). Выраженная тенденция к ускорению начала цветения у хамефитов при потеплении ранней весной обусловлена, как правило, наличием зимующих листьев, что позволяет перераспределять питательные вещества в пользу образования цветков, а не новых листьев (Iversen *et al.*, 2009). У геофитов большие траты на вегетативный рост, тем более в условиях запаздывающего начала вегетации, отсрочивают фазу цветения. Промежуточное положение занимают гемикриптофиты, 21% которых составляют зимнезеленые и факультативно зимнезеленые виды. Средние даты появления зрелых семян во всех группах приурочены к полному лету, но их тренды разнонаправленны: для хамефитов и геофитов показана задержка, тогда как у большинства гемикриптофитов семена созревали заметно быстрее (–5 дней).

При сравнении биоморфологических групп многолетников становится очевидным, что более слабые фенологические тренды в исследуемый

Таблица 3. Тренды репродуктивной фенологии биоморфологических групп

Группа	$Me\{\sigma_{68,2}\}$	$\Delta L\{\sigma_{68,2}\}$	$R^2$	$N^-$	$N^+$
Префлоральный период, дни					
Хамефиты	57 {–9, 7}	–9{–4, 5}	0.19	10	61
Гемикриптофиты	53 {–9, 8}	–7{–4, 6}	0.14	16	66
Геофиты	37 {–7, 7}	–1{–7, 4}	0.16	29	46
Начало цветения					
Хамефиты	26.06 {–5, 6}	–1{–6, 2}	0.08	19	37
Гемикриптофиты	25.06 {–6, 7}	–3{–5, 7}	0.12	31	51
Геофиты	09.06 {–6, 6}	2{–3, 3}	0.11	23	48
Период цветения, дни					
Хамефиты	41{–10, 8}	4{–7, 6}	0.11	21	41
Гемикриптофиты	39{–11, 11}	3{–11, 13}	0.18	31	52
Геофиты	18{–5, 6}	–1{–7, 3}	0.18	29	43
Зрелые семена					
Хамефиты	06.08{–6, 6}	4{–7, 5}	0.24	19	46
Гемикриптофиты	10.08{–7, 8}	–5{–7, 13}	0.25	28	56
Геофиты	08.08{–8, 7}	1{–8, 8}	0.21	31	44

Примечание. Обозначения — см. табл. 2.

период наблюдались у геофитов: меньше величина смещений фенофаз  $\Delta L$ , ниже процент видов  $N^+$ , поддерживающих тренды, и выше процент видов  $N^-$  с противоположным изменением фенологии. Это связано, по-видимому, с характером почек возобновления геофитов: они лучше защищены от перепадов температур в начале сезона и у многих видов хорошо дифференцированы, что снижает зависимость от погодных флуктуаций. По результатам интродукционных исследований, луковичные, клубнелуковичные и клубневые геофиты представляют наиболее консервативную группу травянистых многолетников с точки зрения их сезонной фенологии (Головкин, 1988). Хамефиты более устойчивы к колебаниям метеоусловий благодаря медленному расходованию запасов питательных веществ в зимующих листьях, о чем свидетельствует самая высокая среди биоморфологических групп доля видов, которые не изменили свою фенологию, как вегетативную, так и репродуктивную. Большинство хамефитов следуют доминирующим трендам фенологических смещений.

Наиболее отзывчивой на межгодовые колебания климатических показателей выглядит группа гемикриптофитов, судя по трендам начала вегетации, длительности префлорального периода, начала цветения и созревания семян. Их почки возобновления, расположенные у поверхности почвы, испытывают прямое воздействие снеготаяния и солнечной инсоляции ранней весной, в отличие от геофитов. Более высокая фенологическая чувствительность гемикриптофитов может быть обусловлена также

типом развития побегов: среди них гораздо больше видов с моноциклическими побегами (чем у геофитов), темпы формирования которых в значительной степени опосредованы условиями текущего сезона.

Обзор литературных источников показывает, что у большинства растений разных жизненных форм смещения фенофаз следуют за изменением климатических показателей, у 10–12 % видов наблюдается противоположная тенденция, а 16–18 % индифферентны к текущим трансформациям климата (Parmesan, Yohe, 2003; Khanduri *et al.*, 2008). Полученные нами данные показывают, что около половины фенологических событий не синхронизированы с межгодовыми метеотрендами. Это может быть связано с периодом исследования, для большей части которого по всему Северному полушарию отмечалось замедление темпов потепления и даже похолодание, когда тренды в фенологии растений не прослеживались (Piao *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). В Западной Сибири темпы потепления были значительно ниже, чем в Европейской части, а в период до 2012 г. отмечалось похолодание ( $-0.6^\circ\text{C}/10$  лет); из месяцев теплого сезона года более холодным стал май (Лучицкая, 2014; Седьмое..., 2017). Другим фактором, затрудняющим выявление фенологических трендов, выступают сильные межгодовые колебания климатических показателей (Badeck *et al.*, 2004). Вычисленные нами смещения фенологических событий на уровне групп статистически недостоверны из-за наличия разнонаправленных тенденций у отдельных видов, составляющих группы. При этом коэффициенты детерминации

выше нулевых значений ( $0.07 < R^2 < 0.26$ ) указывают на весомый вклад трендов — до 26% в межгодовую вариабельность фенологии.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена оценка фенологических тенденций у многолетних растений *ex situ* в условиях лесостепи Западной Сибири на фоне изменения регионального климата. Выявлены неоднородные смещения в биоморфологических группах видов, которые отражают сложную реакцию многолетников на межгодовые флуктуации климатических показателей. Установлено, что доминирующие тренды фенологии (запаздывания начала вегетации, сокращения префлорального периода и длительности вегетации) обусловлены внутрисезонными трендами погоды. При этом тренды летних и осенних фенологических событий менее последовательны по направлению и величине, чем весенние. Результаты нашего исследования подтверждают влияние жизненной формы на фенологический отклик растений. Реакции гемикриптофитов и хамефитов свидетельствуют о большей пластичности в меняющихся условиях, чем у геофитов. Фенология всех изученных многолетников за 20-летний период значительно изменилась, но статистическая достоверность этих изменений по большей части не доказана.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках государственного задания по проекту АААА-А21-121011290025-2 “Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными методами” и в рамках бюджетного проекта № FWNR-2022-0020 “Системная биология и биоинформатика: реконструкция, анализ и моделирование структурно-функциональной организации и эволюции генных сетей человека, животных, растений и микроорганизмов”. При подготовке статьи использовались материалы Биоресурсной научной коллекции ЦСБС СО РАН, УНУ “Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте”, USU44053.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бейдеман И. Н.* Методика изучения фенологии растений и растительных сообществ. Новосибирск: Наука. Сиб. отд., 1974. 155 с.
- Воронина Л. В., Гриценко А. Г.* Климат и экология Новосибирской области. Новосибирск: СГГА, 2011. 227 с.
- Головкин Б. Н.* Культурный ареал растений. М.: Наука, 1988. 184 с.
- Жмылев П. Ю., Жмылева А. П., Карпухина Е. А., Титовец А. В.* Возможные причины изменения сезонного развития растений в связи с потеплением климата // Вестник РУДН. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. 2001. № 9. С. 98—103.
- Карпионовна Р. А.* Травянистые растения широколиственных лесов СССР: эколого-флористическая и интродукционная характеристика. М.: Наука, 1985. 205 с.
- Котеров А. Н., Ушенкова Л. Н., Зубенкова Э. С., Калинина М. В., Бирюков А. П., Ласточкина Е. М., Молодцова Д. В., Вайнсон А. А.* Сила связи. Сообщение 2. Градации величины корреляции // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64. № 6. DOI: 10.12737/1024-6177-2019-64-6-12-24
- Луцкая И. О., Белая Н. И., Арбузов С. А.* Климат Новосибирска и его изменения / Под ред. Р. А. Ягудина. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2014. 224 с.
- Седьмое национальное сообщение Российской Федерации, представленное в соответствии со статьями 4 и 12 Рамочной Конвенции Организации Объединенных Наций об изменении климата и статьей 7 Киотского протокола. М., 2017. 270 с.
- Серебряков И. Г.* Жизненные формы высших растений и их изучение // Полевая геоботаника. М.-Л., 1964. Т. 3. С. 146—205.
- Фомина Т. И.* Биологические особенности декоративных растений природной флоры в Западной Сибири. Новосибирск: Академическое изд-во «ГЕО», 2012. 179 с.
- Фомин Э. С., Фомина Т. И.* Изменение фенологии многолетних растений в Западной Сибири на фоне глобального потепления климата // Сиб. экол. журн. 2021. № 5. С. 543—556. [Fomin E. S., Fomina T. I. Changes in the phenology of perennial plants in Western Siberia against the background of global climate warming // Contemp. Probl. Ecol. 2021. N 5. P. 543—556]. DOI:10.15372/SEJ20210504
- Шульц Г. Э.* Общая фенология. Л.: Наука, 1981. 188 с.
- Aerts R.* The advantages of being evergreen // TREE. 1995. V. 10(10). P. 402—407.
- Badeck F.-W., Bondeau A., Böttcher K., Doktor D., Lucht W., Schaber J., Sitch S.* Responses of spring phenology to climate change // New Phytologist. 2004. V. 162. P. 295—309. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2004.01059.x
- Berend K., Haynes K., McDonough MacKenzie C.* Common garden experiments as a dynamic tool for ecological

- studies of alpine plants and communities in North-eastern America: Featured review // *Rhodora*. 2019. V. 121. № (987). P. 174—212. DOI: 10.3119/18—16
- Bertin R. I.* Plant phenology and distribution in relation to recent climate change // *J. Torrey Bot. Soc.* 2008. V. 135. № (1). P. 126—146. DOI: 10.3159/07-RP-035R.1
- Chmura H. E., Kharouba H. M., Ashander J., Ehlman S. M., Rivest E. B., Yang L. H.* The mechanisms of phenology: the patterns and processes of phenological shifts // *Ecol. Monogr.* 2019. V. 89. № (1). P. e01337. DOI: 10.1002/ecm.1337
- Cleland E. E., Chuine I., Menzel A., Mooney H. A., Schwartz M. D.* Shifting plant phenology in response to global change // *Trends Ecol. Evol.* 2007. V. 22. № (7). P. 357—365. DOI: 10.1016/j.tree.2007.04.003
- Efron B.* Bootstrap methods: Another look at the jackknife // *Ann. Stat.* 1979. V. 7. № (1). P. 1—26. DOI: 10.1214/aos/1176344552
- Franks S. J., Weber J. J., Aitken S. N.* Evolutionary and plastic responses to climate change in terrestrial plant populations // *Evol. Appl.* 2014. V. 7. № (1). P. 123139. DOI: 10.1111/eva.12112
- Ge Q., Wang H., Rutishauser T., Dai J.* Phenological response to climate change in China: A meta-analysis // *Glob. Chang. Biol.* 2015. V. 21. № (1). P. 265—274. DOI: 10.1111/gcb.12648
- Gordo O., Sanz J.* Impact of climate change on plant phenology in Mediterranean ecosystems // *Glob. Chang. Biol.* 2010. V. 16. P. 1082—1106. DOI: 10.1111/j.1365-2486.2009.02084.x
- Gratani L.* Plant phenotypic plasticity in response to environmental factors // *Advances in Botany*. V. 2014. Article ID 208747. DOI: 10.1155/2014/208747
- Huang W., Dai J., Wang W., Li J., Feng C., Du J.* Phenological changes in herbaceous plants in China's grasslands and their responses to climate change: a meta-analysis // *Int. J. Biometeorol.* 2020. V. 64. P. 1865—1876. DOI: 10.1007/s00484-020-01974-1
- Iversen M., Bråthen K. A., Yoccoz N. G., Ims R. A.* Predictors of plant phenology in a diverse high-latitude alpine landscape: growth forms and topography // *J. Veg. Sci.* 2009. V. 20. P. 903—915. DOI: 10.1111/j.1654—1103.2009.01088.x
- Khanduri V. P., Sharma C. M., Singh S. P.* The effects of climate change on plant phenology // *Environmentalist*. 2008. V. 28. P. 143—147. DOI: 10.1007/s10669-007-9153-1
- König P., Tautenhahn S., Cornelissen J. H. C., Kattge J., Bönsch G., Römermann C.* Advances in flowering phenology across the Northern Hemisphere are explained by functional traits // *Glob. Ecol. Biogeogr.* 2018. V. 27. № (3). P. 310—321. DOI: 10.1111/geb.12696
- Kubov M., Schieber B., Janík R.* Effect of selected meteorological variables on full flowering of some forest herbs in the Western Carpathians // *Atmosphere*. 2022. V. 13. Article 195. DOI: 10.3390/atmos13020195
- Lehoczyk A., Szabó B., Pongrácz R., Szentkirályi F.* Testing plant phenophase as proxy: Sensitivity analysis of first flowering data from the 19<sup>th</sup> century // *Appl. Ecol. Environ. Res.* 2016. V. 14. № (2). P. 213—233. DOI: 10.15666/aeer/1402\_213233
- Lippmann R., Babben S., Menger A., Delker C., Quint M.* Development of wild and cultivated plants under global warming conditions // *Curr. Biol.* 2019. V. 29. P. 1326—1338. DOI: 10.1016/j.cub.2019.10.016
- Menzel A., Sparks T. H., Estrella N., Koch E., Aasa A., Ahas R., Kübler K. A., Bissolli P., Braslavská O., Briede A., Chmielewski F. M., Crepinsek Z., Curnel Y., Dahl A., Defila C., Donnelly A., Filella Y., Jatzcak K., Måge F., Mestre A., Nordli Ø., Peñuelas J., Pirinen P., Remišová V., Scheifinger H., Striz M., Susnik A., Vanvliet A. J. H., Wielgolaski F. E., Zach S., Züst A.* European phenological response to climate change matches the warming pattern // *Glob. Chang. Biol.* 2006. V. 12. P. 1969—1976. DOI: 10.1111/j.1365—2486.2006.01193.x
- Menzel A., Yuan Y., Matiu M., Scheifinger H., Gehrig R., Estrella N.* Climate change fingerprints in recent European plant phenology // *Glob. Chang. Biol.* 2020. V. 26. P. 2599—2612. DOI: 10.1111/gcb.15000
- Miller-Rushing A. J., Inouye D. W., Primack R. B.* How well do first flowering dates measure plant responses to climate change? The effects of population size and sampling // *J. Ecol.* 2008. V. 96. P. 1289—1296. DOI: 10.1111/j.1365—2745.2008.01436.x
- Mo F., Zhang J., Wang J., Cheng Z.-G., Sun G.-J., Ren H.-X., Zhao X.-Z., Cheruiyot W. K., Kavagi L., Wang J.-Y., Xiong Y.-C.* Phenological evidence from China to address rapid shifts in global flowering times with recent climate change // *Agric. For. Meteorol.* 2017. V. 246. P. 22—30. DOI: 10.1016/j.agrformet.2017.06.004
- Parmesan C., Yohe G.* A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems // *Nature*. 2003. V. 421. P. 37—42. DOI: 10.1038/nature01286
- Peñuelas J., Rutishauser T., Filella I.* Phenology feedbacks on climate change // *Science*. 2009. V. 324(5929). P. 887—888. DOI: 10.1126/science.1173004
- Piao S., Liu Q., Chen A., Janssens I. A., Fu Y., Dai J., Liu L., Lian X., Shen M., Zhu X.* Plant phenology and global climate change: Current progresses and challenges // *Glob. Chang. Biol.* 2019. V. 25. P. 1922—1940. DOI: 10.1111/gcb.14619
- Primack R. B., Ellwood E. R., Gallinat A. S., Miller-Rushing A. J.* The growing and vital role of botanical gardens in climate change research // *New Phytologist*. 2021. V. 231. P. 917—932. DOI: 10.1111/nph.17410
- Raunkiaer C. R.* The life forms of plants and statistical plant geography. Oxford: Clarendon Press, 1934. 719 p.
- Robbirt K. M., Davy A. J., Hutchings M. J., Roberts D. L.* Validation of biological collections as a source of phenological data for use in climate change studies: a case study with the orchid *Ophrys sphegodes* // *J. Ecol.* 2011. V. 99. P. 235—241. DOI: 10.1111/j.1365—2745.2010.01727.x
- Root T. L., Price J. T., Hall K. R., Schneider S. H., Rosenzweig C., Pounds J. A.* Fingerprints of global warming on wild animals and plants // *Nature*. 2003. V. 421. P. 57—60. DOI: 10.1038/nature01333

- Rosbakh S., Hartig F., Sandanov D. V., Bukharova E. V., Miller T. K., Primack R. B. Siberian plants shift their phenology in response to climate change // *Glob. Chang. Biol.* 2021. V. 27. P. 4435—4448. DOI: 10.1111/gcb.15744
- Singh K. On the asymptotic accuracy of Efron's bootstrap // *Ann. Stat.* 1981. V. 9. № (6). P. 1187—1195. DOI: 10.1214/aos/1176345636
- Sparks T. H., Menzel A. Observed changes in seasons: An overview // *Int. J. Climatol.* 2002. V. 22. P. 1715—1725. DOI: 10.1002/joc.821
- Walther G.-R., Post E., Convey P., Menzel A., Parmesan C., Beebee T. J. C., Fromentin J.-M., Hoegh-Guldberg O., Bairlein F. Ecological responses to recent climate change // *Nature.* 2002. V. 416. P. 389—395.
- Wang X., Xiao J., Li X., Cheng G., Ma M., Zhu G., Arain M. A., Black T. A., Jassal R. S. No trends in spring and autumn phenology during the global warming hiatus // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. Article 2389. DOI: 10.1038/s41467-019-10235-8
- Yun J., Jeong S.-J., Ho C.-H., Park C.-E., Park H., Kim J. Influence of winter precipitation on spring phenology in boreal forests // *Glob. Chang. Biol.* 2018. V. 11. P. 5176—5187. DOI: 10.1111/gcb.14414
- Zani D., Crowther T. W., Mo L., Renner S. S., Zohner C. M. Increased growing-season productivity drives earlier autumn leaf senescence in temperate trees // *Science.* 2020. V. 370. P. 1066—1071. DOI: 10.1126/science.abd8911

## Phenological response of plants of different biomorphs to climate change in Western Siberia

© 2024 E. S. Fomin\*, T. I. Fomina\*\*, #

\**Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Lavrentyev av., 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

\*\**Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Zolotodolinskaya str., 101, Novosibirsk, 630090 Russia*

#*E-mail: fomina-ti@yandex.ru*

The results of a phenology study of 78 species of perennial plants from biomorphological groups of chamaephytes, hemicryptophytes and geophytes over a 20-year period (1996—2015) are discussed. Against the background of air temperature and precipitation changes of the warm season in Novosibirsk, the timing shift in phenological events have been analyzed using calculated linear trends. It is found that the trends for species groups are multidirectional and vary significantly in magnitude. At the same time, most of the shifts in phenology are due not to trends, but to the interannual variability of climatic indicators.

**Keywords:** meteorological trends, phenological trends, chamaephytes, hemicryptophytes, geophytes, Western Siberia.

УДК 576.895.122:598.2(470.22)

## ВИДОВОЙ СОСТАВ ДЕФИНИТИВНЫХ ХОЗЯЕВ ТРЕМАТОДЫ *BILHARZIELLA POLONICA* (СЕМ. SCHISTOSOMATIDAE) ЮЖНОЙ КАРЕЛИИ (СЕВЕРО-ЗАПАД РОССИИ)

© 2024 г. Г. А. Яковлева

Институт биологии — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”,  
ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск, 185910, Россия

E-mail: galina\_il87@mail.ru

Поступила в редакцию 19.04.2023

После доработки 28.06.2023

Принята к публикации 29.06.2023

Проведены исследования гельминтофауны 398 особей водоплавающих птиц, относящихся к 43 видам, обитающих на водно-болотных угодьях Южной Карелии (Северо-Запад России). Впервые получены данные о видовом составе и зараженности птиц — окончательных хозяев шистосоматид *Bilharziella polonica*. Из числа исследованных видов птиц *B. polonica* зарегистрирована только у семи видов — кряквы, чирка-свистунка, чирка-трескунка, обыкновенного гоголя, хохлатой чернети, широконоски и серошейной поганки, заражение которой для Северо-Запада России отмечено впервые. Показана роль инвазированных трематодой птиц в поддержании очага церкариоза, патогенного для человека, — “болезни купальщиков”. Приведены данные, свидетельствующие о том, что цикл развития трематоды успешно реализуется в условиях Карелии.

**Ключевые слова:** *Bilharziella polonica*, церкариоз, водоплавающие птицы, Карелия.

**DOI:** 10.31857/S1026347024030046, **EDN:** VAVFPZ

Своеобразие ландшафтов Карелии с обилием озер, рек, водохранилищ и заболоченных территорий, а также прохождение Беломоро-Балтийского миграционного пути обусловили формирование разнообразной и относительно многочисленной фауны водно-болотных птиц. Большинство видов птиц Европейского Севера России дважды в год совершает сезонные миграции. Всего на территории Карелии (Северо-Запад России) насчитывается около 100 видов птиц. Они играют важную роль в функционировании водоема как единого целого, благодаря чему формируются разнообразие и динамика их паразитофауны, среди которой есть виды, способные вызывать заболевания у животных и человека. К таким видам относятся шистосомы — паразиты кровеносной системы птиц, имеющие сложный жизненный цикл, включающий моллюсков и водно-болотных птиц. К ним относятся представители десяти родов — *Dendrobilharzia* Skrjabin & Zakharov, 1920, *Gigantobilharzia* Odhner, 1910, *Allobilharzia* Kolářová, Rudolfová, Hampl & Skirnisson, 2006, *Austrobilharzia* Johnston, 1917, *Anserobilharzia* Brant, Jouet, Ferte & Loker, 2013, *Trichobilharzia* Skrjabin & Zakharov, 1920, *Bilharziella* Looss, 1899, *Macrobilharzia* Travassos, 1923, *Ornithobilharzia* Odhner, 1912 и *Jilinobilharzia* Liu & Bai, 1976 (Lashaki *et al.* 2020; Lorenti *et al.* 2022). Церкарии этих паразитов способны проникнуть через

кожу человека, вызывая аллергическую реакцию или церкариозный дерматит (Kolářová *et al.*, 1999; Horák, Kolářová, 2000; Kouřilová *et al.*, 2004; Беэр, Воронин, 2007; Faltýnková *et al.*, 2007; Kolářová, 2007; Jouet *et al.*, 2009; Хейдорова, 2012; Horák *et al.*, 2015 и др.).

По современным представлениям, церкариозы встречаются в обоих полушариях, от Северного полярного круга до южных территорий Африканского, Южноамериканского, Австралийского материков (Беэр, Воронин, 2007). Церкариозы широко распространены в России и на территории соседних европейских стран. Северная граница распространения церкариозов проходит в европейской части России примерно на широте Санкт-Петербурга, хотя единичные случаи известны и севернее — в Республике Коми и даже в 100 км севернее г. Кеми в Карелии (Беэр, Воронин, 2007). Примерно до этих же широт ареалы шистосоматид доходят на север в Финляндии и на Аляске (Harkema, 1953, 1955, 1960; Pirila, Wikgren, 1957).

В условиях Европейской части наиболее часто встречаются церкариозные дерматиты, вызываемые представителями группы *Trichobilharzia ocellata* (La Valette St. George, 1855) Brumpt, 1931 (*T. szidati*, *T. franki*, *T. regenti*) и *Bilharziella polonica* (Kowalewski, 1895) Looss, 1899 (Беэр и др., 1995; Воронин, Беэр, 2002; Семенова и др., 2005; Беэр, Воронин, 2007;

Хрисанфова и др., 2011; Ткачева, 2020 и др.). Территория Карелии (Северо-Запад России) в отношении птичьих шистосоматид, распространения их в промежуточных и окончательных хозяевах, изучена слабо. Нами ранее были отмечены находки шистосоматид у различных видов птиц — краквы, речной и полярной крачек (Яковлева и др., 2013, 2015; Яковлева, Лебедева, 2015; Лебедева и др., 2019).

В рамках данного исследования была предпринята попытка изучить видовой состав дефинитивных хозяев и зараженность водно-болотных птиц висцеральными шистосомами *B. polonica* на Северо-Западе России (на примере водосборного бассейна Ладожского и Онежского озер).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом послужили водно-болотные птицы, добытые на Северо-Западе России (бассейн Ладожского и Онежского озер) в 2010—2020 гг. (рис. 1). Всего было исследовано 398 особей 43 видов 10 различных семейств: Gaviidae Allen, 1897 (1 вид), Podicipedidae Bonaparte, 1831 (2 вида), Phalacrocoracidae Reichenbach, 1850 (1 вид), Ardeidae Vigors, 1825 (1 вид), Anatidae Vigors, 1825 (16 видов), Rallidae Vigors, 1825 (2 вида), Charadriidae Vigors, 1825 (3 вида), Scolopacidae Vigors, 1825 (9 видов), Stercorariidae Brisson, 1760 (1 вид), Laridae Vigors, 1825 (7 видов). Птицы были добыты в естественной



**Рис. 1.** Карта-схема мест добычи водно-болотных птиц. Бассейн Ладожского озера: 1 — Олонецкий район. Бассейн Онежского озера: 2 — Прионежский район (Онежское озеро); 3 — Кондопожский район (оз. Пертозеро).

природной среде (разрешенные места для отстрела в сезоны охоты), а также использованы особи, погибшие в рыболовных орудиях (садки, ставные сети). Основной материал был собран на акватории Ладожского озера (Олонецкий район).

После сбора птицы были упакованы в индивидуальные пакеты, пронумерованы, подписаны и доставлены в термостатирующем боксе в лабораторию, где были заморожены для последующего исследования. Исследованных особей условно разделяли на две группы: молодых (имеют фабрицеву сумку) и взрослых (зрелые особи без фабрицевой сумки), также проведено определение половой принадлежности птиц.

Паразитологическое обследование птиц проводили согласно М. Н. Дубининой (1971). На наличие гельминтов исследовали желудок, сердце, печень, почки, легкие и трахею, вскрытия головного и спинного мозга не проводилось. В процессе вскрытия проводилась идентификация остатков пищи в кишечном тракте птиц. Взрослых червей находили в кровеносных сосудах кишечника, брыжейки и печеночных сосудов и фиксировали в 96 % этаноле, окрашивали в ацетокармине, обезвоживали, заключали в канадский бальзам. Все обнаруженные гельминты были половозрелыми.

Систематический список видов приведен в соответствии с Всемирным регистром морских видов (WoRMS Editorial Board, 2023). Для идентификации использовали морфометрические методы,

основанные на систематических ключах (Определитель трематод..., 1985; Khalil, 2002). Морфологическое исследование паразитов проводили с использованием видеосистемы Olympus CX-41 (Olympus Corporation, Токио, Япония) и Levenhuk C1400 NG, программное обеспечение Levenhuk TouView V.3.5 (оборудование Центра коллективного пользования Карельского научного центра РАН).

Для количественной характеристики зараженности птиц использованы стандартные паразитологические показатели (Bush *et al.*, 1997). Сравнение показателей зараженности проводилось только у особей птиц, численность которых была больше 10 штук. Статистическую обработку всех полученных фаунистических результатов проводили в пакетах программ Past и Quantitative Parasitology (Reiczigel *et al.*, 2019).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У большей части обследованных видов птиц (36 видов) — большая поганка (10 экз.), чернозобая гагара (1 экз.), большой баклан (3 экз.), серая цапля (1 экз.), белолобый гусь (29 экз.), гуменник (19 экз.), белошекая казарка (10 экз.), свиязь (12 экз.), шилохвость (1 экз.), морская чернеть (7 экз.), морянка (9 экз.), турпан (1 экз.), синьга (2 экз.), средний крохаль (6 экз.), лысуха (26 экз.), погonyш (1 экз.), золотистая

**Таблица 1.** Видовой состав и зараженность водно-болотных птиц трематодой *B. polonica* на территории Южной Карелии (Северо-Запад России)

Вид хозяина / Водоем	Южная Карелия (Северо-Запад России)						Ладожское озеро		Оз. Пертозеро		Онежское озеро	
	N	n	P	ЭИ, % [CI]	Мин-макс.	ИО [CI]	N	n	N	n	N	n
<i>Podiceps grisegena</i> (Boddaert, 1783)	1	1	2	1 из 1	2	2	1	1	—	—	—	—
<i>Anas platyrhynchos</i> Linnaeus, 1758	53	29	794	54.7 [41—68.1]	1—208	15 [7.4—30]	39	24	6	4	8	1
<i>A. crecca</i> Linnaeus, 1758	22	8	601	36.4 [18.7—58.2]	1—334	27.3 [2.1—83.5]	22	8	—	—	—	—
<i>Aythya fuligula</i> (Linnaeus, 1758)	5	1	3	1 из 5	3	0.6	5	1	—	—	—	—
<i>Bucephala clangula</i> (Linnaeus, 1758)	25	4	81	16 [5.7—35.7]	3—51	3.2 [0.4—12.4]	25	4	—	—	—	—
<i>Spatula clypeata</i> (Linnaeus, 1758)	4	3	21	3 из 4	6—8	5.25	3	3	1	0	—	—
<i>S. querquedula</i> (Linnaeus, 1758)	2	1	2	1 из 2	2	1	2	1	—	—	—	—
Всего	112	47	1504	—	—	—	97	42	7	4	8	1

Примечание: N — количество обследованных птиц, особи; n — количество зараженных птиц, особи; P — количество паразитов, экз.; ЭИ — экстенсивность инвазии, %; Мин-макс. — значения интенсивности инвазии, экз. паразитов на 1 зараженную особь; ИО — индекс обилия паразитов, среднее число паразитов на 1 обследованную особь; [CI] — доверительные интервалы (Reiczigel *et al.*, 2019).

ржанка (3 экз.), тулес (1 экз.), чибис (2 экз.), камнешарка (1 экз.), чернозобик (3 экз.), исландский песочник (1 экз.), гаршнеп (1 экз.), большой кроншнеп (2 экз.), средний кроншнеп (1 экз.), турухтан (5 экз.), вальдшнеп (2 экз.), большой улит (3 экз.), короткохвостый поморник (1 экз.), малая чайка (29 экз.), серебристая чайка (15 экз.), сизая чайка (49 экз.), клуша (2 экз.), озерная чайка (5 экз.), речная (16 экз.) и полярная крачки (6 экз.), шистосоматиды не были обнаружены. Трематода *B. polonica* найдена у 7 видов (табл. 1) — кряква, чирок-свистунок, обыкновенный гоголь, широконосок, хохлатая чернеть, чирок-трескунок и серошекая поганка.

Гельминты локализовались в кровеносных сосудах кишечника, печени, почек и сердца. Сведения о встречаемости и интенсивности заражения представлены в табл. 1. Наибольшие показатели заражения отмечены для кряквы и чирка-свистунка. Трематода *B. polonica* представлены самцами и самками, соотношение полов — 24♂:8♀, размерные характеристики червей соответствовали описанию в определителе.

Максимальные значения встречаемости шистосоматид отмечены для кряквы (54.7%), несколько ниже у чирка-свистунка (36.4%) и обыкновенного гоголя (16%). Количества обследованных птиц других видов, у которых были найдены трематоды, в наших исследованиях были единичными (табл. 1). Интенсивность заражения птиц варьировала от 1 до 334 особей. Следует отметить, что заражение отдельных особей кряквы и чирка-свистунка характеризовалось выраженной агрегированностью распределения численности паразитов. Данный тип распределения паразитов означает, что большинство обследованных особей кряквы и чирка-свистунка имели невысокие значения интенсивности заражения и лишь единичные особи имели высокие значения численности трематод. Среди взрослых крякв в начале мая была добыта одна особь, у которой найдено 208 трематод. Значения интенсивности заражения весной и осенью для других особей кряквы (26 экз.) изменялись от 1 до 33 трематод. Среди чирков было встречено две птицы с максимальными значениями интенсивности 334 и 224 экз. Одна из них была добыта в августе, другая — в сентябре, при этом одна была взрослой, а другая — молодой. Для других 6 зараженных особей чирков интенсивность весной и осенью колебалась от 1 до 18 трематод у одной особи хозяина.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно литературным данным, трематоды *B. polonica* являются паразитами нерыбоядных гусеобразных, гагар, поганок, цапель, чаек и крачек (Определитель трематод..., 1985). В качестве дефинитивных хозяев для этих трематод указывается 42 вида водно-болотных птиц различных семейств (Скрябин, 1951; Быховская-Павловская, 1962; Смогоржевская, 1976; Юрлова, 1979; Некрасов и др., 1982; Тупицын,

Тимошенко, 1996; Sitko *et al.*, 2006; Syrota *et al.*, 2018; Виноградова, Скворцов, 2022; Akramova *et al.*, 2022 и др.). Среди исследованных в нашем материале 43 видов (398 особей) водно-болотных птиц 36 (351 особь) не были заражены трематодой *B. polonica* (табл. 1).

Большинство исследованных массовых видов гусей на территории Карелии являются пролетными видами (Носков и др., 2016). В южной части Карелии (на Олонецких сельскохозяйственных полях) находятся только их весенние стоянки. Гнездиться птицы предпочитают либо в северной части Карелии, либо на Белом море. Шистосоматиды у пролетных гусей нами не обнаружены. Исследованные на пролете гуси преимущественно кормились на полях, что подтверждается содержанием растительности в желудочно-кишечном тракте. Кроме того, миграция гусей проходит ранней весной, когда церкарии еще не сформировались. Исследованные связи (12 экз.) не были заражены трематодой *B. polonica*. Участие этих птиц в циркуляции шистосоматид отмечено в Новосибирской области и на европейском Северо-Востоке России, при этом имели низкие показатели зараженности (Юрлова, 1979; Екимова, 1989; Юшков, 1996). Также, согласно литературным данным, представители сем. Laridae отмечены в качестве окончательных хозяев для трематод *B. polonica* только в бассейне оз. Байкал (Скрябина, 1962 а, б; Ошмарин, 1965; Некрасов и др., 1982; Тупицын, Тимошенко, 1996). В нашем материале исследованные виды чаек и крачек не были заражены этой трематодой. Для Карелии у чаек известны находки шистосоматид *Gigantobilharzia mazuriana* Khalifa, 1974 (Лебедева и др., 2019).

Различные представители сем. Anatidae, согласно литературным данным, указываются в качестве окончательных хозяев *B. polonica* для водоемов России, Белоруссии и других европейских стран (Скрябин, 1951; Быховская-Павловская, 1962; Rudolfová *et al.* 2002, 2007; Дороженкова и др., 2006; Bayssade-Dufour *et al.*, 2006; Sitko *et al.*, 2006; Беэр, Воронин, 2007; Jouet *et al.* 2009; Хейдорова, 2011; Akramova *et al.*, 2022 и др.). Согласно нашим данным, кряква, чирок-свистунок и обыкновенный гоголь показали высокую встречаемость и интенсивность заражения трематодами (табл. 1). Высокая экологическая пластичность этих видов птиц, проявляемая при выборе мест для гнездования, большое сходство и широкий спектр потребляемых кормов — все это определяет их общность в поддержании численности *B. polonica*. Основные места зимовок крякв, чирка-свистунка и обыкновенного гоголя, обитающих на Северо-Западе России, расположены в северной части западной Европы (Швеция, Норвегия, Дания, Германия, Нидерланды) и в Великобритании, хотя отдельные особи могут зимовать и в южной Европе, вплоть до юга Франции, Италии и Греции (Резвый и др., 1995; Бианки, Добрынина, 1997; Носков и др., 2016).

Определить точное время интродукции трематод *B. polonica* достаточно сложно. Однако факт заноса шистосоматид мигрирующими птицами из мест

зимовки является неоспоримым. У кряквы из 794 экз. трематод весной обнаружено 228 червей, у чирка-свистунка из 601 экз. весной найдено 39. Согласно литературным данным (Зимин, Ивантер, 2002), гнездование большинства утиных птиц в Карелии начинается в мае, птенцы появляются к середине июня и быстро переходят на самостоятельное питание. Исследованные нами осенью молодые кряквы были заражены 188 трематодами, у чирка-свистунка число обнаруженных трематод составило 562 экз. Весенние особи обыкновенного гоголя не были инвазированы *V. polonica*, однако осенью у молодых птиц была зарегистрирована 81 трематода. Эти данные позволяют говорить об успешной натурализации трематоды *V. polonica* в водоемах Северо-Запада России (бассейн Ладожского озера). Наши данные указывают на важность изучения шистосом, так как угроза здоровью, связанная с шистосоматидными трематодами, требует дальнейшего изучения путем постоянного мониторинга паразитов на всех стадиях цикла развития.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного исследования впервые получены данные о видовом разнообразии и зараженности дефинитивных хозяев трематодой *V. polonica*. Основными носителями шистосоматидной инвазии являются кряква, чирок-свистунок и обыкновенный гоголь в связи с экологическими особенностями вида и физиологической приуроченности к ним гельминта.

В целом, полученные данные по распределению и зараженности различных видов птиц шистосоматидами соотносятся с литературными, характерными для Палеарктики. Однако наблюдаются некоторые отличия, связанные с особенностями экологии водно-болотных птиц, которые могут быть обусловлены глобальным потеплением, быстро идущим процессом синантропизации и увеличением численности видов в городской среде.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарен д. б. н. Е. П. Иешко за ценные замечания и предложения при подготовке рукописи статьи, а также д. б. н. А. В. Артемьеву за помощь в определении вида и возраста птиц и признателен рецензенту за полезные комментарии к рукописи статьи.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (FMEN-2022-0005, № г. р. 122032100130-3).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что у него нет конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит никаких исследований с участием животных в экспериментах, выполненных автором.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Безр С.А., Воронин М.В. Церкариозы в урбанизированных экосистемах. М.: Наука, 2007. 240 с.
- Безр С.А., Колосовский Б.С., Солонец Т.М., Герман С.М., Дороженкова Т.Е., Чистенко Г.Н., Веденьков А.Л., Шалапенко Е.С. Методические рекомендации по диагностике, медико-экологической экспертизе и профилактике церкариозов // МЗ Республики Беларусь. Минск, 1995. 13 с.
- Бианки В.В., Добрынина И.Н. Миграции птиц Восточной Европы и Северной Азии. Пластинчатоклювые. Речные утки. М.: Наука, 1997. 318 с.
- Быховская-Павловская И.Е. Трематоде птиц СССР: эколого-географический обзор. 1962. М.-Л.: Изд-во АН СССР. 321 с.
- Виноградова А.А., Скворцов В.В. Гельминтофауна утиных Северо-Запада России и Эстонии // Паразитология. 2022. Т. 56. № 2. С. 108—125. <https://doi.org/10.31857/S0031184722020028>
- Воронин М.В., Безр С.А. Особенности морфологии шистосоматидных церкарий группы *Trichobilharzia cf ocellata* из популяций Москвы и Санкт-Петербурга // Паразитология. 2002. Т. 36. № 1. С. 60—70.
- Дороженкова Т.Е., Околотович С.И., Колосовский Б.С. Церкариозы как медико-биологическая проблема озера Нарочь // Материалы научно-практической конференции «Актуальные проблемы гигиены и эпидемиологии». Минск. 2006. С. 267—272.
- Дубинина М.Н. Паразитологическое исследование птиц. Л.: Наука. Ленинградское отделение, 1971. 140 с.
- Екимова Е.Н. Трематоде водоплавающих и околоводных птиц восточноевропейских тундр // Тр. Коми науч. центра УрО АН СССР. 1989. № 100. С. 111—115.
- Зимин В.Б., Ивантер Э.В. Птицы. Петрозаводск: ПетрГУ, 2002. 288 с.
- Лебедева Д.И., Яковлева Г.А., Артемьев А.В. Паразиты речной (*Sterna hirundo*) и полярной (*Sterna paradisaea*) крачек (Charadriiformes, Laridae) в Карелии // Зоологический журнал. 2019. 98. № 9. С. 1019—1024. <https://doi.org/10.1134/S2075111720010129>
- Некрасов А.В., Санжиева С.Д., Егоров В.Г. Гельминтофауна водоплавающих птиц оз. Байкал //

- Биологические ресурсы Забайкалья и их охрана. Улан-Удэ: БФ СО АН СССР, 1982. С. 69—81.
- Носков Г.А., Рымкевич Т.А., Гагинская А.Р. Миграции птиц Северо-Запада России. Неворобьиные. СПб.: Изд-во АНО ЛА «Профессионал», 2016. 656 с.
- Определитель трематод рыбоядных птиц Палеарктики (брахилаймиды, клиностомиды, циклоцелиды, фасциолиты, нотокотилиды, плагиорхиды, шистосоматиды). М.: Наука, 1985. 256 с.
- Ошмарин П.Г. К фауне гельминтов промысловых животных Бурятии // Паразитические черви домашних и диких животных. Владивосток: ДВ филиала СО АН СССР, 1965. С. 209—212.
- Резвый С.П., Савинич И.Б., Носков Г.А., Гагинская А.Р., Ковалев В.А., Бузун В.А., Афанасьева Г.А., Рымкевич Т.А., Смирнов О.П., Смирнов Е.Н., Шутенко Е.В. Атлас миграций птиц по данным кольцевания в Ленинградской области // Тр. СПб о-ва естествоиспыт. 1995. Т. 85. Вып. 4. 232 с.
- Семенова С.К., Хрисанфова Г.Г., Филиппова Е.К., Безр С.А., Воронин М.В., Рысков А.П. Индивидуальная и популяционная изменчивость церкарий шистосоматид группы *Trichobilharzia ocellata* (Trematoda, Schistosomatidae), выявляемая с помощью полимеразной цепной реакции // Генетика. 2005. Т. 41. № 1. С. 17—22.
- Скрябин К.И. Трематоды животных и человека. Основы трематодологии. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1951. Т. 5. 624 с.
- Скрябина В.И. К гельминтофауне чирка-свистунка // Тр. Баргузинского заповедника. Иркутск, 1962а. Вып. 4. С. 221—225.
- Скрябина В.И. К гельминтофауне кряквы и домашней утки Восточной Сибири // Опыт борьбы с заболеваниями сельскохозяйственных животных Иркутской области. Иркутск. 1962б. С. 68—69.
- Смогоржевская Л.А. Гельминты водоплавающих и болотных птиц фауны Украины. Киев: Наукова Думка, 1976. 416 с.
- Ткачева Н. Изучение развития церкарий *Bilharziella polonica* (Trematoda: Schistosomatidae) // Материалы XXI Межвузовской студенческой научной конференции “Студент — исследователь — учитель”. СПб.: Изд-во РГПУ им. А.И. Герцена, 2020. С. 182—190.
- Тупицын И.И., Тимошенко Т.М. О куликах дельты Селенги (разнообразие, численность, гельминты) // Сохранение биологического разнообразия в Байкальском регионе: проблемы, подходы, практика. Улан-Удэ: БНЦ СО РАН, 1996. Т. 2. С. 32—34.
- Хейдорова Е.Э. Видовой состав дефинитивных хозяев трематод семейства Schistosomatidae (*Trichobilharzia* sp., *Bilharziella polonica*) на озере Нарочь // Ученые записки учреждения образования “Витебская ордена “Знак Почета” государственная академия ветеринарной медицины”. Витебск, 2011. Т. 47. Вып. 2. Ч. 1. С. 106—109.
- Хейдорова Е.Э. Закономерности популяционных взаимодействий водоплавающих птиц и птичьих шистосом как фактора церкариозной опасности водоемов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Минск, 2012. 18 с.
- Хрисанфова Г.Г., Лопаткин А.А., Шестак А.Г., Мищенко В.А., Жукова Т.В., Акимова Л.Н., Семенова С.К. Полиморфизм гена *cox1* мтДНК церкариальных изолятов птичьей шистосомы *Bilharziella polonica* (класс Trematoda, сем. Schistosomatidae) из водоемов Беларуси // Генетика. 2011. Т. 47. № 5. С. 684—690.
- Юрлова Н.И. Гельминты диких утиных птиц юга Западной Сибири: дис. канд. биол. наук. Новосибирск. 1979. 246 с.
- Юшков В.Ф. Трематоды птиц семейства Anatidae Европейского Северо-Востока России // Тр. Коми науч. центра УрО РАН. 1996. № 148. С. 128—139.
- Яковлева Г.А., Лебедева Д.И. Роль утиных птиц в расселении трематоды *Bilharziella polonica* (Kowalewski, 1895) Looss, 1899 на территории Карелии // Тезисы 19-й международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых “Биология — наука XXI века”. 2015. Пушкино: Институт физиологии растений РАН. С. 454.
- Яковлева Г.А., Лебедева Д.И., Иешко Е.П. Эколого-фаунистические особенности видового состава трематод водно-болотных птиц Карелии // Труды Карельского научного центра РАН. 2013. № 2. С. 108—110. <https://doi.org/10.17076/eco119i>
- Яковлева Г.А., Лебедева Д.И., Иешко Е.П. Трематоды водно-болотных птиц Карелии (по материалам 319-й союзной гельминтологической экспедиции 1958—1962 годов) // Труды Карельского научного центра РАН. 2015. № 2. С. 95—110. <https://doi.org/10.17076/eco119i>
- Akramova F., Shakarbaev U., Yorkulov Z., Arepbaev I., Mirzaeva A., Azimov D. Life cycle of *Bilharziella polonica* (Trematoda, Schistosomatidae) parasite of semi-aquatic birds in Uzbekistan // Biosyst. Divers. 2022. V. 30. № 2. P. 137—142. <https://doi.org/10.15421/012213>
- Bayssade-Dufour C., Jouet D., Rudolfová J., Horák P., Ferté H. Seasonal morphological variations in bird schistosomes // Parasite. 2006. V. 13. P. 205—214.
- Bush A.O., Lafferty K.D., Lotz J.M., Shostak A.W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited // J. Parasitol. 1997. V. 83. № 4. P. 575—583.
- Faltýnková A., Niewiadomska K., Santos M.J. and Valtonen T.E. Furcocercous cercariae (Trematoda) from freshwater snails in Central Finland // Acta Parasitol. 2007. V. 52. № 4. P. 310—317. <https://doi.org/10.2478/s11686-007-0050-z>
- Harkema R. Study of Alaskan Schistosomes // Arctic Aeromed. Lab. 1953. Ladd Air Force Base, Alaska, Proj. 22-1401-005. P. 1—26.
- Harkema R. Further Study of Alaskan schistosomes // Arctic Aeromed. Lab. 1955. Ladd AFB, Alaska, Rpt. № 3. P. 1—15.

- Harkema R.* Further Study of Alaskan schistosomes // Arctic Aeromed. Lab. 1960. Ladd Air Force Base, Alaskan Air Command. P. 1–23 p.
- Horák P., Kolářová L.* Survival of bird Schistosomes in mammalian lungs // Int. J. Parasitol. 2000. V. 30. № 1. P. 65–68.
- Horák P., Mikeš L., Lichtenbergová L., Skála V., Solďánová M., Brant S.V.* Avian schistosomes and outbreaks of cercarial dermatitis. Clin Microbiol. 2015. Rev 28. P. 165–190. <https://doi.org/10.1128/CMR.00043-14>
- Jouet D., Ferte H., Hologne C., Kaltenbach M. L., Depaquit J.* Avian schistosomes in French aquatic birds: a molecular approach // J. Helminthol. 2009. V. 83. P. 181–189. <https://doi.org/10.1017/S0022149X09311712>
- Khalil L.F.* Family Schistosomatidae Stiles & Hassall, 1898 // Keys to the Trematoda. V. 1. / Eds Gibson D. I., Jones A., Bray R. A.; Wallingford: CAB International and the Natural History Museum, 2002. P. 419–432.
- Kolářová L.* Schistosomes causing cercarial dermatitis: a mini-review of current trends in systematics and of host specificity and pathogenicity // Folia Parasitol. 2007. V. 54. P. 81–87.
- Kolářová L., Skirnisson K., Horak P.* 1999. Schistosome cercariae as the causative agent of swimmers itch in Iceland // J. Helminthol. 1999. V. 73. P. 215–220.
- Kouřilová P., Hogg K.G., Kolářová L., Mountford A.P.* Cercarial dermatitis caused by bird schistosomes comprises both immediate and late phase cutaneous hypersensitivity reaction // J. Immunol. 2004. V. 172. P. 3766–3774.
- Lashaki E.K., Teshnizi S.H., Gholami S., Fakhar M., Brant S.V., Dodangeh S.* Global prevalence status of avian schistosomes: A systematic review with meta-analysis // Parasite Epidemiol Control. 2020. 9. e00142. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00142>
- Lorenti E., Brant S.V., Gilardoni C., Diaz Ju.I. and Cremonete F.* Two new genera and species of avian schistosomes from Argentina with proposed recommendations and discussion of the polyphyletic genus *Gigantobilharzia* (Trematoda, Schistosomatidae) // Parasitol. 2022. Feb 4. P. 1–59. <https://doi.org/10.1017/S0031182022000130>
- Pirilä V., Wikgren B.J.* Cases of swimmers itch in Finland // Acta Dermato-Venerologica. 1957. V. 37. P. 140–148.
- Reiczigel J., Marozzi M., Fábrián I., Rózsa L.* Biostatistics for parasitologists — a primer to quantitative parasitology // Trends in Parasitol. 2019. V. 35. P. 277–281. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.003>
- Rudolfová J., Sitko J., Horak P.* Nasal schistosomes in wildfowl in the Czech Republic // Parasitol. Res. 2002. V. 88. P. 1093–1095.
- Rudolfová J., Littlewood D.T.J., Sitko J., Horak P.* Bird schistosomes of wildfowl in the Czech Republic and Poland // Folia parasitol. 2007. V. 54. P. 88–93.
- Sitko J., Faltýnková A., Scholz T.* Checklist of the Trematodes (Digenea) of birds of the Czech and Slovak Republics. Praha: Academia, 2006. V. 1. 111 pp.
- Syrota Ya. Yu., Greben O.B., Poluda A.M., Maleha O.M., Lisitsyna O.I., Korniyushin V.V.* Helminths of the Mallard, *Anas platyrhynchos* (Aves Anatidae), in Ukraine: Analysis of the Diversity in Mixed Forest Zone and the Black Sea Region // Vestn. Zool. 2018. V. 52. № 4. P. 267–278. <https://doi.org/10.2478/vzoo-2018-0028>
- WoRMS Editorial Board. World Register of Marine Species. 2023. Available from <https://www.marinespecies.org> at VLIZ. Accessed 2023-04-17. doi:10.14284/170

## The species composition of the definitive hosts of the trematode *Bilharziella polonica* (Schistosomatidae) of Southern Karelia (Northwestern Russia)

© 2024 G. A. Yakovleva

*Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Pushkinskaya St. 11, Petrozavodsk, 185910 Russia  
E-mail: galina\_il87@mail.ru*

We performed a parasitological survey of helminths of 398 waterfowl specimens from an ecologically unique territory of southern Karelia (North-West Russia). This is the first study of species composition and infection of birds that are definitive hosts of *Bilharziella polonica* have been obtained. The trematoda of *Bilharziella polonica* has been recorded only in seven species of birds — mallard, teal, garganey, goldeneye, tufted duck, shoveler, and red-necked grebe. The species of *B. polonica* has been recorded of red-necked grebe for the North-West of Russia for the first time. The role of infected birds of *Bilharziella polonica* in support of schistosomiasis, a disease that causes morbidity for causing human cercarial dermatitis or swimmer's itch, were shown. We present data that life cycle of *Bilharziella polonica* is successfully implemented in the conditions of Karelia.

*Keywords: Bilharziella polonica, cercarial dermatitis or swimmer's itch, waterfowls, Karelia.*

## РЕШИТЕЛЬНОСТЬ КАК ИНДИВИДУАЛЬНАЯ ЧЕРТА ПОВЕДЕНИЯ В ПРИРОДНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ПТИЦ

© 2024 г. Т. А. Ильина\*<sup>@</sup>, А. В. Киселева\*, А. В. Бушуев\*, Е. В. Иванкина\*\*, А. Б. Керимов\*

\* Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,  
кафедра зоологии позвоночных, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия

\*\* Звенигородская биологическая станция им. С.Н. Скадовского Московского государственного университета  
имени М.В. Ломоносова, п/о Шихово, Московская обл., 143036 Россия

@E-mail: ilyina@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 03.03.2023

После доработки 30.06.2023

Принята к публикации 30.06.2023

Индивидуальную решительность при возобновлении кормления птенцов выявляли в тестах с предъявлением незнакомого объекта у гнезд мухоловки-пеструшки (*Ficedula hypoleuca*) в естественной среде. В течение четырех гнездовых сезонов было протестировано 229 особей, из которых 41 — от 2 до 4 раз. Повторное тестирование одних и тех же птиц проводили на разных гнездах с интервалами от 3 до 1103 дней (Med=367). Контролировали число и возраст птенцов, сроки гнездования, пол и возраст особи и ее партнера, наличие линьки, интенсивность кормления птенцов и поведение партнера, а также наличие одновременной бигамии у самца. Выявлена достоверная повторяемость результатов тестирования на значительных интервалах времени ( $R=0.21$ ), что свидетельствует об устойчивости во времени индивидуальной реакции (решительности) особи на фоне меняющихся условий естественной среды.

**Ключевые слова:** индивидуальность, решительность, тест на новизну, гнездовой период, мухоловка-пеструшка, *Ficedula hypoleuca*.

**DOI:** 10.31857/S1026347024030053, **EDN:** VAVEXO

Разнообразие особей внутри популяции или иной группировки определяет особенности ее существования (Шилов, 1977, 2001). Помимо таких демографических параметров, как соотношение полов и возрастных когорт, большую роль играют морфологические, физиологические, поведенческие и другие характеристики особей. Хорошо известно, что особи разных морфологических типов могут занимать разные субниши в общей популяционной нише и в меняющейся среде поочередно получать преимущество, сохраняя, в целом, внутривидовой баланс между типами (Гриньков, 2000). Физиология и поведение животных более пластичны, чем морфологические черты, это позволяет особям быстро адаптироваться при смене обстановки. Адаптации на популяционном уровне происходят не только за счет широты нормы реакции индивидуумов, но и за счет многообразия типов особей по этим характеристикам (Шилов и др., 1974; Шилов, 2001). В последние два десятилетия наблюдается взрывной рост числа работ, посвященных индивидуальным признакам, которые могут служить типологическими характеристиками животных. Если раньше в исследованиях придавали значение увеличению объема выборки как средству для повышения точности анализа, то позднее вариативность результатов и ее причины сами стали

предметом изучения (Forsman *et al.*, 2015; Murren *et al.*, 2015). Этому способствовало совершенствование методов работы, благодаря чему разброс в полученных результатах стали рассматривать не только как ошибки измерений или случайные «помехи», а как отражение естественного разнообразия особей и процессов в природных популяциях (Koolhaas *et al.*, 1999; Шилов, 2001; Dingemanse *et al.*, 2002; Both *et al.*, 2003; Drent *et al.*, 2003; Sih *et al.*, 2004; Groothuis, Carere, 2005; Herborn *et al.*, 2010; Houston, 2010; Garamszegi *et al.*, 2012; Pusch, Navara, 2018; Васильева, 2021). Возник особый подход к внутривидовой разнокачественности поведения особей, когда в фокусе внимания оказалась индивидуальность животного (personality), или, в иных терминах, темперамент (temperament), поведенческий синдром (behavioral syndrome) (Sih *et al.* 2004; Réale *et al.* 2007; Dingemanse, Wolf, 2010; Klueen, Brommer, 2013). В таких работах количественные характеристики поведения особей, то есть черты индивидуальности (personality traits), представлялись как континуум, на краях которого расположены два контрастных варианта, при этом типологизация особей носила относительный характер.

Для количественной оценки ряда поведенческих признаков была предложена реакция особи на новизну — новый объект или новую обстановку. В качестве

показателя этой реакции использовали такие признаки, как подвижность — число движений в «открытом поле» (Burt, Giltz, 1973; Dingemanse *et al.*, 2002; Drent *et al.*, 2003) и решительность — латентное время от начала теста до приближения особи к тестовому объекту (Dingemanse *et al.*, 2002; Drent *et al.*, 2003; Минина и др., 2018), а при тестировании в сложной среде — сумму латентностей при обследовании нескольких объектов (Ильина и др., 2010). Распределение особей по этим показателям представляло собой непрерывный ряд: особей с большим числом движений или с короткими латентностями относили к «проактивному» (proactive) («быстрому» (fast), «решительному» (bold)) типу, а особей с противоположными характеристиками — к «реактивному» (reactive) («медленному» (slow), «робкому» (shy)). Было выявлено, что показатели в тестах на новизну положительно коррелируют между собой и с другими поведенческими чертами, в первую очередь с такими, как агрессивность (Burt, Giltz, 1973; Verbeek *et al.*, 1996, 1999; Dingemanse, de Goede, 2003) и готовность к проявлению риска (risk-taking) (Drent *et al.*, 2003; Van Oers *et al.*, 2005).

В первое время тестирование для оценки поведенческих признаков проводили на животных, содержащихся в искусственных условиях в течение всей своей жизни (Шилов и др., 1974; Dingemanse *et al.*, 2002; Both *et al.*, 2003; Drent *et al.*, 2003; Van Oers, 2003; Van Oers *et al.*, 2004; Dingemanse, Wolf, 2010), либо на свободноживущих, которых кратковременно изымали из природы для тестирования, а потом выпускали обратно (Dingemanse *et al.*, 2002; Van Oers *et al.*, 2008; Klueen, Brommer, 2013). Как правило, тестирование птиц проводили в стандартных лабораторных условиях, применяя в качестве «открытого поля» специально оборудованную вольеру или небольшую клетку, и лишь недавно были предприняты попытки к использованию тестов на новизну в природе. Проведение тестов было приурочено к сезону гнездования, когда незнакомый предмет прикрепляли к объекту, вызывающему мотивацию к проявлению либо брачного (Garamszegi *et al.*, 2014), либо родительского поведения (Timm *et al.*, 2015; Vrublevska *et al.*, 2015; Ильина и др., 2022). В первом случае это была клетка с самкой, предъявляемая холостым самцам на их территории, а во втором — собственная дуплянка с птенцами.

В отличие от лаборатории, в естественной среде значительно труднее стандартизировать проведение теста, так как внешние и внутренние факторы могут сильно влиять на поведение особи, маскируя ее индивидуальные черты. Экспериментатор не может влиять на природные факторы, но для оценки действия этих факторов на поведение особи можно проводить тестирование в разных ситуациях и оценивать степень повторяемости результатов. В то время как повторные тестирования одних и тех же особей в стандартных условиях были проведены на нескольких видах птиц (Dingemanse *et al.* 2002; Klueen *et al.*,

2012; Klueen, Brommer, 2013), аналогичные сведения о тестах в природе практически отсутствуют. В одной из немногих работ по тестированию в естественной среде (Vrublevska *et al.*, 2015) авторы сравнивали реакцию больших синиц на мячик розового цвета, положенный на крышку дуплянки, с аналогичной реакцией на желтый мячик и обнаружили значительную корреляцию между полученными результатами. Тесты проводили с интервалом в двое суток на одном и том же выводке, вероятность повторения результатов через большой промежуток времени при выкармливании другого выводка осталась неизвестной. Вместе с тем исследования на многих видах животных показали, что повторяемость отдельных количественных характеристик поведения особи может снижаться при увеличении интервала между регистрациями (Bell *et al.*, 2009). Следует при этом отметить, что сила связи между разными чертами поведения, которые могут рассматриваться как типологические, со временем остается неизменной (Garamszegi *et al.*, 2012).

Тесты в естественной обстановке малоинвазивны по сравнению с методами, требующими кратковременного изъятия птиц и помещения их в экспериментальные условия. На наш взгляд, одна из актуальных методических задач — проверка воспроизводимости индивидуальных результатов тестирования на разных видах птиц, в первую очередь на тех, которые служат в качестве модельных объектов в популяционно-экологических исследованиях. Наша работа ставит целью исследовать на мухоловках-пеструшках (*Ficedula hypoleuca*) решительность как устойчивый во времени индивидуальный признак, оценивая повторяемость реакции птицы на незнакомый объект в последовательных тестах при ее гнездовании на разных участках с одновременной сменой партнера.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Район исследования и характеристика локальной популяции.** Работа проведена в западном Подмосковье (55.7°N, 36.7°E), на Звенигородской биостанции им. С. Н. Скадовского Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова в 2018—2022 гг. Территория биостанции площадью более 700 га включает участки хвойного и смешанного леса, где в годы исследования было размещено около 500 искусственных гнездовий (дуплянок). На протяжении более чем 40 лет во время сезона гнездования осуществляются регулярная проверка дуплянок, отлов и мечение птиц. Более подробные сведения о месте работ и о самой локальной популяции модельного вида, мухоловки-пеструшки (*Ficedula hypoleuca*), трансконтинентального мигранта с моноциклическим в течение сезона размножением, а также о методах отлова и мечения птиц приведены в наших более ранних публикациях (Керимов и др., 1994; Ильина и др., 2019).

**Тестирование птиц.** Мы проводили тесты на мухоловках-пеструшках в естественной обстановке, непосредственно у гнезд с птенцами старшего возраста (9—15 сут). В этом возрасте птенцы уже не нуждаются в обогреве и поведение как самцов, так и самок в основном связано с кормлением птенцов и реагированием на появление хищников или на другие факторы беспокойства. Число птенцов в гнездах варьировало от двух до девяти. За сутки до начала тестирования на то место, куда планировали ставить видеокамеру, на расстоянии 1.5—2.5 м от дуплянки с гнездом размещали ее муляж, чтобы приучить птиц к проведению видеосъемки. Было выявлено, что после замены привычного муляжа на камеру птицы все равно сначала демонстрировали страх перед ней. Мы решили проверить, можно ли использовать реакцию мухоловок на видеокамеру как один из тестов на неophobia (тест 1). Через три часа после установки видеокамеры на переднюю стенку дуплянки под летком прикрепляли лист белой бумаги формата А5 (тест 2) по аналогии с методом, апробированным Гарамсеги с соавторами (Garamszegi *et al.*, 2014) на самцах мухоловки-белошейки (*Ficedula albicollis*) в предгнездовой период. После установки объекта экспериментатор включал видеокамеру и уходил, момент включения видеокамеры считали началом тестирования. В каждом из тестов регистрировали время, через которое птица с кормом проникала внутрь дуплянки (возобновление кормления). Во время установки экспериментальных объектов, как правило, было видно или слышно беспокоящихся хозяев гнезд. После ухода человека они успокаивались и через некоторое время прилетали с кормом к гнезду. Акустический и визуальный контроль за присутствием птиц в ближайших окрестностях гнезда позволил расценивать случаи с большой задержкой прилета как реакцию на потенциально опасный объект, а не как следствие долгой отлучки за пределы гнездового участка. Поведение птицы во время теста квалифицировали как проявление решительности. Время произошедшего события регистрировали по видеозаписи в минутах и секундах, после чего последние переводили в доли минут с точностью до десятичного знака. По видеозаписи, которая шла между тестами на протяжении приблизительно трех часов, считали число прилетов каждого из родителей с кормом и оценивали средний интервал между прилетами в режиме обычного кормления. Для видеосъемки использовали видеокамеры моделей Sony SR-80E и Panasonic HC-V750EE, отснятый материал просматривали при помощи программы VLC media player.

В течение всего периода исследований были проведены тесты на мухоловках-пеструшках из 150 гнезд. В 25 гнездах птенцов выкармливали одиночные родители (6 самцов и 19 самок), а в 135 — семейные пары. Всего протестировано 229 особей, для них получено 293 измерения, из них 109 — для 28 самцов и 13 самок, протестированных от двух до четырех раз (средневзвешенный размер кластера — 2.363). Все повторные

тесты проведены на разных гнездовых участках с интервалами от 3 до 1103 дней ( $Med = 367$ ). Ни одна из пар не была встречена на другом гнезде в том же составе; два самца и три самки, помимо тестирования совместно с партнером, участвовали в другом тесте как кормильцы-одиночки. Все повторные тестирования самок были межсезонными. Повторные тесты девяти самцов-полигамов (бигамов) были проведены в один и тот же гнездовой сезон, причем шесть из этих самцов были протестированы еще и в составе моногамных пар в другие 1 или 2 сезона. Число пар измерений одной и той же птицы в соседние сезоны равнялось 54, а пар измерений с еще большими интервалами — 14. Фактор бигамии, а также фактор наличия партнера мы учитывали при анализе данных. Контролировали также число и возраст птенцов (сут), сроки гнездования (порядковый номер дня тестирования, отсчитываемый от 1 мая), пол особи, отсутствие или наличие линьки и ее интенсивность в баллах (Bairlein, 1995), интенсивность кормления птенцов как самой особью, так и ее партнером (средний за три часа видеозаписей интервал между прилетами с кормом), латентное время партнера в том же тесте, а также возраст особи и ее партнера. Птиц разделяли на две возрастных когорты — годовалые особи и особи в возрасте двух лет и старше. Возраст оценивали по степени заостренности центральных рулевых (Высоцкий, 1989), а также по рисунку на дистальных больших верхних кроющих маховых перьях и степени их обношенности (Lundberg, Alatalo, 1992).

**Статистические методы.** Попарные сравнения между показателями тестов и контролем проводили при помощи критерия Уилкоксона в программе StatSoft Statistica 12.0. Для оценки повторяемости показателей тестирования результаты обрабатывали с применением смешанных моделей (LMM) в статистической среде R v. 4.2.2 (R Core Team, 2022). LMM были построены при помощи функции 'rptR' из одноименного пакета (Stoffel *et al.*, 2017). В качестве зависимой переменной в LMM выступали логарифмированные показатели одного из двух поведенческих тестов (теста 1 и теста 2 в отдельности). Случайным фактором в LMM являлся индивидуальный номер кольца птицы (ID), а фиксированным эффектом служил один фактор из следующего набора: пол особи, возраст особи и ее партнера (годовалая или старше), сроки наблюдения (число дней, прошедшее с 1 мая), число и возраст птенцов в выводке, линька (наличие/отсутствие или ее балл), год, интенсивность кормления птенцов особью или ее партнером, полигамность в текущем сезоне (для самцов), показатель партнера в том же поведенческом тесте, который выступает в качестве зависимой переменной в данной модели. Повторяемость, оцененная при помощи LMM с учетом фиксированных факторов, представляет собой т.н. скорректированную повторяемость (adjusted repeatability) (Nakagawa, Schielzeth, 2010).

Соответствие распределения остатков моделей, деленных на их скорректированную стандартную

ошибку (studentized residuals), Гауссовому мы проверили при помощи функции 'check\_normality' из пакета 'performance' (Lüdecke *et al.*, 2020). Статистическая значимость повторяемости (значение  $p$ ) была вычислена при помощи 10000 пермутаций. Для оценки асимптотических доверительных интервалов повторяемости (95% CI) использовали 10000 параметрических бутстрэпов. Коэффициенты детерминации ( $R^2$ ) для LMM вычисляли по методу Nakagawa, Schielzeth (2013), используя функцию 'r2' из пакета 'performance' (Lüdecke *et al.*, 2020). LMM для оценки  $R^2$  были построены при помощи функции 'lmer' из пакета 'lme4' (Bates *et al.*, 2015). Мы использовали два различных варианта коэффициентов детерминации — маргинальный (marginal  $R^2$ ) и условный (conditional  $R^2$ ). Первый показатель демонстрирует ту долю вариации, которая объясняется одними только фиксированными факторами, а второй показывает долю вариации, которую объясняет полная смешанная модель. Сравнимая величины обоих коэффициентов детерминации, можно оценить, какая часть дисперсии зависимой переменной связана со случайным фактором (ID птицы), а не с фиксированным эффектом. Для оценки уровня значимости ( $p$ ) фиксированных факторов в LMM была использована аппроксимация числа степеней свободы (df) при помощи метода Саттервайта (Satterthwaite's approximation), реализованного в пакете 'lmerTest' (Kuznetsova *et al.*, 2017).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Реакция на новые объекты.** Время, через которое особь возобновляла принос корма птенцам после установки незнакомого объекта, значимо превышало средний интервал между прилетами в режиме обычного кормления. Это прослеживалось после появления как видеокamеры, тест 1 (критерий Уилкоксона  $Z=6.91$ ,  $n=280$ ,  $p<0.001$ ), так и листа белой бумаги, тест 2 (критерий Уилкоксона,  $Z=9.88$ ,  $n=281$ ,  $p<0.001$ ), причем в последнем случае, когда новый объект фигурировал непосредственно на самой дуплянке, задержка со входом в дуплянку (тест 2) была выше, чем в первом, когда объект был установлен на расстоянии (тест 1) (критерий Уилкоксона,  $Z=3.53$ ,  $n=278$ ,  $p<0.001$ ).

**Повторяемость результатов тестирования на одном и том же гнезде.** Между показателями тестирования обнаружена значимая связь. Чем быстрее птица решалась проникнуть внутрь дуплянки в первом тесте, тем быстрее она решалась сделать это и во втором тесте ( $R=0.43$ ,  $SE=0.049$ ,  $CI=[0.328, 0.522]$ ,  $p=1e-04$  [Permutation]), а при введении в модель второго случайного фактора в виде индивидуального номера кольца птицы, чтобы учесть наличие повторных тестирований одной и той же особи,  $R=0.34$ ,  $SE=0.088$ ,  $CI=[0.149, 0.488]$ ,  $p=1e-04$  [Permutation]).

**Повторяемость результатов тестирования на разных гнездах и анализ фиксированных эффектов.**

Индивидуальные показатели реакции на видеокamеру (тест 1) относительно сильно варьировали у одной и той же птицы в разных циклах гнездования, проверка их повторяемости не позволила считать эту повторяемость значимой ( $p>0.05$ ). В то же время анализ показателей в тесте с листом бумаги (тест 2) выявил иную картину: повторяемость результатов в тесте 2 оказалась безусловной ( $R=0.21$ ,  $CI=[0, 0.447]$ ,  $p<0.05$ ), то есть она была значимой как без учета фиксированных факторов, так и при учете каждого из них (табл. 1). По результатам бутстрэп-анализа показателей теста 2, несмотря на левостороннюю асимметрию гистограммы (рис. 1), которая хорошо визуализирует полученную нами достоверную повторяемость результатов тестирования, частота значений с нулевой повторяемостью не доминировала над суммой остальных частот. Для сравнения, ранее было выявлено, что такой физиологический показатель, как независимый от массы тела уровень базального метаболизма (BMR), не продемонстрировал у тропических птиц межсезонной повторяемости (Bushuev *et al.*, 2021) и визуализация этого феномена имела иной, чем в нашем исследовании, характер: значение частот на гистограмме, соответствующее величине  $R$ , не было выражено в виде пика, а частота нулевых значений была на порядок выше, чем любая другая из частот.

Поочередное включение в Смешанную линейную модель (LMM) в качестве фиксированных факторов некоторых переменных приводило к ее существенному улучшению (табл. 1, столбец Conditional  $R^2$ ), в частности, фактор «Балл линьки» улучшал модель на 16.2%, а фактор «Интенсивность кормления птенцов» — на 51.4%. Оба фактора имели положительную связь с показателями тестирования (соответственно

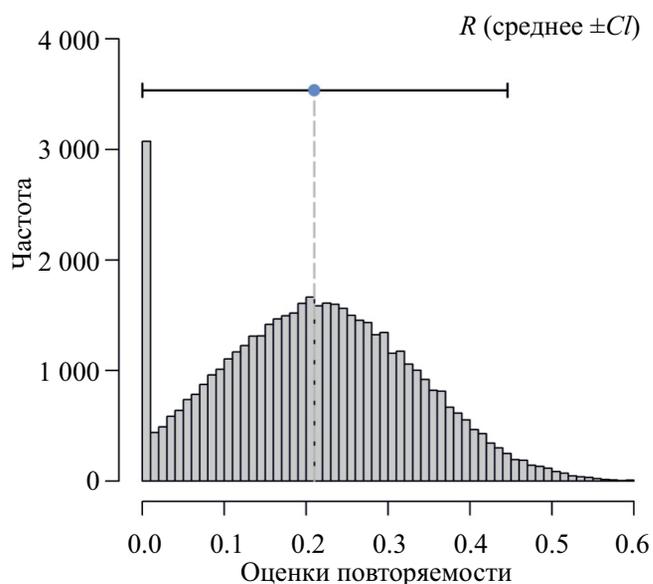


Рис. 1. Результаты бутстрэп-анализа результатов теста 2: R — повторяемость, CI — доверительный интервал.

$t=2.23$  и  $t=6.26$ ), то есть птицы с более высоким баллом линьки и с более длинными интервалами между кормлениями птенцов (величина, обратная частоте кормления) позже возобновляли кормление. Значимыми также оказались такие факторы, как пол и возраст особи, а также наличие или отсутствие партнера и показатели тестирования последнего (табл. 1), но вклад каждого из них не превышал 10%, то есть был менее весомым, чем у двух первых упомянутых выше. Птицы в возрасте двух лет или старше возобновляли кормление быстрее, чем годовалые особи ( $t= -2.15$ ), а родители-одиночки — быстрее, чем при наличии партнера ( $t=2.42$ ). Связь с показателями тестирования партнера была положительной ( $t=1.995$ ). При наличии во время тестирования большого количества действующих факторов вклад в модель случайного фактора «идентификатор особи» (ID) был наиболее существенным по сравнению со вкладами фиксированных факторов (табл. 1, столбец Marginal R<sup>2</sup>).

Время, через которое возобновлялось кормление (тест 2), как было отмечено выше, в большинстве случаев было больше, чем средний интервал между прилетами с кормом, поэтому отношение между этими показателями можно было рассматривать в качестве относительной силы реакции особи на новый объект. Мы оценили повторяемость логарифмов отношения первого показателя ко второму. Ее величина была близка к статистически значимой ( $R=0.187$ , CI= [0, 0.426],  $p=0.06$ ), а при последовательном включении

в модель таких факторов, как «пол особи», «возраст особи», «возраст партнера», «балл линьки», величины повторяемости варьировали от 0.199 до 0.232 при уровне значимости  $p<0.05$ .

Раздельный анализ межсезонной и внутрисезонной повторяемости результатов теста 2 продемонстрировал, что обе эти величины становятся значимыми при включении в модель дополнительных факторов. При сравнении показателей, полученных в разные годы, это фиксированный фактор «число птенцов», а для показателей внутри одного сезона — «балл линьки» (соответственно  $R=0.211$ , CI= [0, 0.486],  $p=0.04$  и  $R=0.622$ , CI= [0, 0.937],  $p=0.0488$ ). Без учета этих факторов оба значения повторяемости не отличались значимо от нуля (соответственно  $R=0.177$ , CI= [0, 0.443],  $p=0.0996$  и  $R=0.382$ , CI= [0, 0.807],  $p=0.131$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наличие достоверной связи средней силы между показателями в двух последовательных тестах, проведенных на одном и том же гнезде, продемонстрировало относительную устойчивость реакции особи на различные показатели новизны на фоне действия большого числа факторов, оказывающих дополнительное влияние. Вместе с тем между тестами были обнаружены существенные различия по значениям повторяемости результатов, полученных после

**Таблица 1.** Анализ повторяемости результатов теста с листом бумаги (теста 2) при помощи линейной смешанной модели

Фиксированный фактор	Повторяемость для случайного фактора — (ID)			Характеристики смешанной модели		
	R	CI	P [Permut]	Conditional R <sup>2</sup>	Marginal R <sup>2</sup>	p
Отсутствует	0.210	[0, 0.447]	0.046	0.21	0	
Пол особи	0.201	[0, 0.462]	0.041	0.203	0.023	0.014
Срок наблюдения	0.213	[0, 0.457]	0.026	0.213	0.001	0.699
Возраст птенцов	0.206	[0, 0.448]	0.029	0.207	0	0.771
Число птенцов	0.244	[0, 0.483]	0.014	0.25	0.008	0.126
Возраст особи	0.219	[0, 0.472]	0.027	0.232	0.016	0.033
Есть/нет линька	0.212	[0, 0.474]	0.035	0.231	0.025	0.0099
Балл линьки	0.229	[0, 0.489]	0.029	0.244	0.019	0.027
Календарный год	0.215	[0, 0.457]	0.026	0.215	0	0.842
Есть/нет партнер	0.184	[0, 0.43]	0.039	0.200	0.020	0.016
Возраст партнера	0.228	[0, 0.488]	0.024	0.231	0.004	0.289
Показатель партнера в том же тесте <sup>1)</sup>	0.211	[0, 0.476]	0.037	0.223	0.015	0.047
Интенсивность кормления птенцов (ИКП) <sup>1)</sup>	0.225	[0, 0.471]	0.044	0.318	0.12	<0.001
ИКП партнером <sup>1)</sup>	0.199	[0, 0.469]	0.042	0.199	0.001	0.696
Есть/нет вторая семья	0.165	[0, 0.417]	0.05	0.165	0	0.843

Примечание. 1) — В модели использованы десятичные логарифмы факторов.

одновременной смены гнездового участка и партнера. В тесте с установкой нового объекта в виде треноги с видеокамерой (тест 1) повторяемость результатов фактически не отличалась от нулевых значений. На наш взгляд, причиной этому послужили недостаточно жесткие стандарты проведения эксперимента: в зависимости от характеристики ближайшего окружения дуплянки дистанция, на которой можно было установить треногу с видеокамерой, варьировала от 1.5 до 2.5 м. Различались также углы установки треноги по отношению к плоскости передней стенки дуплянки и степень маскировки растительностью. Не исключено также, что предварительная экспозиция муляжа снижала эффект новизны при установке видеокамеры, что усиливало относительное влияние других факторов. Из этого можно сделать вывод, что, к сожалению, практически невозможно безоговорочно использовать в качестве побочного тестирования на индивидуальность материалы видеосъемки, проводимой с какими-либо другими целями, например при изучении питания птиц. В отличие от теста 1 (реакция на видеокамеру), повторяемость результатов в тесте 2 (реакция на лист белой бумаги) оказалась достоверной, из чего можно заключить, что размещение на разных дуплянках одинаковым образом одного и того же незнакомого объекта может служить адекватным тестом для типологизации поведения птиц-дуплогнездящих в естественной обстановке. Оптимальным показателем оказалось время, которое прошло с момента включения видеокамеры до первого проникновения птицы внутрь дуплянки (тест 2). Наряду с работами других исследователей (Bell *et al.*, 2009), мы обнаружили тенденцию к снижению повторяемости индивидуальных показателей тестирования с увеличением интервала между экспериментами, однако пока что результаты внутрисезонных и межсезонных сравнений мы рассматриваем как предварительные. Во-первых, по причине небольшого размера выборки невозможно исследовать градиент изменений более подробно, сравнив повторяемость в соседние сезоны и повторяемость с интервалами в два и более года. Во-вторых, удивителен факт относительно высокой внутрисезонной повторяемости, так как она основана исключительно на показателях самцов-бигамов. Можно было бы ожидать различий в их поведении при выкармливании птенцов в первых и вторых

гнездах, однако сходство в результатах последовательных тестов самцов-бигамов, хотя и обусловлено действием фиксированного фактора — линьки, указывает на относительно устойчивое проявление их индивидуальности в разных контекстах. Несомненно, необходим дальнейший анализ этого явления с привлечением более обширного материала.

Повторяемость тестов по оценке решительности у диких птиц ранее была выявлена только в экспериментах на больших синицах, которые на протяжении нескольких лет жили в неволе с птенцового возраста (Van Oers *et al.*, 2004). Ее величина была равной 0.26, что сопоставимо с результатами наших тестов 2 ( $R=0.21$ ), в которых доля межсезонных повторов составляет 89%. Основываясь на представлении о целостности фенотипа и скоррелированности черт поведения (Verbeek *et al.*, 1996, 1999; Dingemanse *et al.*, 2002; Dingemanse, de Goede, 2003; Drent *et al.*, 2003; Garamszegi *et al.*, 2012;), хотя такой подход при работе на аквариумных рыбах продемонстрировал негативные стороны (Beckmann, Biro, 2013), мы сравнили повторяемость наших результатов в тесте на решительность (тест 2) с повторяемостью тестов на другую черту, включаемую в типологическую характеристику, а именно на так называемую исследовательскую активность (exploratory behaviour). В качестве регистрируемого показателя этой активности в работах на птицах выступало число локомотий в «открытом поле» (exploration score, activity score). Сравнимые результаты были получены рядом авторов в долгосрочных экспериментах на одних и тех же особях больших синиц (*Parus major*), лазоревок (*Cyanistes caeruleus*) и зябликов (*Fringilla coelebs*) (Dingemanse *et al.*, 2002; Quinn, Cresswell 2005; Klun, Brommer, 2013). Птиц в этих экспериментах периодически изымали на короткое время из природы, тестировали в «открытом поле» их локомоторную активность, после чего отпускали (табл. 2). Судя по величинам повторяемости ( $R$ ), у всех видов, за исключением одной из групп лазоревок, сила связи между результатами тестирования в разные годы варьировала между слабым и средним уровнями (по аналогии со шкалами связей, используемыми в психосоциальных исследованиях (Котеров и др., 2019)). Полученная нами величина ( $R=0.21$ ) сходна с полученными значениями или даже превышает некоторые из них, несмотря на то что тесты на мухоловках-пеструшках были

**Таблица 2.** Повторяемость результатов тестирования в «открытом поле» свободноживущих птиц нескольких видов, кратковременно изымаемых из природы для проведения эксперимента

Вид	Сезон	Величины повторяемости, R	Источник
Большая синица, <i>Parus major</i>	Ноябрь – март	0.27–0.48	Dingemanse <i>et al.</i> , 2002
Лазоревка, <i>Cyanistes caeruleus</i>	Зима	0.18–0.46	Klun, Brommer, 2013
Лазоревка, <i>Cyanistes caeruleus</i>	Гнездование	0–0.24	Klun, Brommer, 2013
Зяблик, <i>Fringilla coelebs</i>	Гнездование	0.39	Quinn, Cresswell 2005

проведены не в “открытом поле”, а под непосредственным влиянием факторов внешней среды. Важно, что небольшое количество внутрисезонных повторов (11 %), которые могут увеличивать повторяемость всех результатов в целом, характеризуют поведение одной и той же особи на разных участках и в присутствии разных партнеров. В отличие от проведенных в условиях неволи работ, в которых результаты тестов не зависели ни от пола, ни от возраста птиц (Dingemanse *et al.*, 2002; Drent *et al.*, 2003; Van Oers, 2003), мы обнаружили, что в природной среде эти характеристики особи достоверно влияли на проявление индивидуальности, хотя и не маскировали ее существенно. Отмечено, что действие некоторых факторов имело противоположную направленность. Наиболее сильное влияние на поведение мухоловок оказывали наличие линьки оперения и интенсивность кормления птенцов. Первый фактор отрицательно связан с проявлением решительности, а второй — положительно. Хорошо известно, что смена пера требует повышенного расхода энергии и, следовательно, конкурирует с другими энергетическими затратами, в частности с такими, как затраты на самоподдержание и родительское поведение (Дольник, 1995). Выявлено, что у самцов мухоловки-пеструшки, совмещающих линьку с гнездованием, сила иммунного ответа на новый антиген обусловлена типом их брачной окраски. В то же время повышение иммунного ответа самцов сопровождается снижением уровня родительской заботы (Керимов и др., 2012; Kerimov *et al.*, 2018). Возможно, пребывание в состоянии линьки, ослабляя родительскую мотивацию, снижает решительность птиц при взаимодействии с незнакомым объектом, но небольшой объем материала не позволяет определить, в какой мере эта причина приводит к выявленному нами эффекту. Интенсивность кормления птенцов перед тестированием и решительность проникнуть в гнездо после появления возле него незнакомого объекта сходным образом зависят от родительской мотивации особи. Вместе с тем, судя по полученным коэффициентам детерминации смешанных моделей, даже самый сильнодействующий фактор (“интенсивность кормления птенцов”) оказывает на модель меньшее влияние, чем случайный фактор (ID) (табл. 1). Значительная роль последнего фактора, являющегося маркером индивида, показывает, что выявленная в работе долгосрочная повторяемость результатов тестирования птиц свидетельствует об устойчивом проявлении индивидуальных черт поведения особи на фоне действия разнообразных внешних и внутренних (связанных с ее мотивационным и физиологическим состоянием) естественных условий.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках научного проекта государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова

№ 121032300108-1 “Надоргазмненныя системы раз-  
личных уровней и механизмы их функционирования  
у позвоночных животных”.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В 2018—2022 гг. исследование было одобрено Комитетом по биоэтике Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова (<http://bioethics.msu.ru>; протоколы №№ 59-ж от 21.04.2017, 88-ж от 18.04.2019, 120-ж от 10.12.2020, 120-ж-2 от 17.03.2022).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Васильева Н.А. Синдром темпа жизни (pace-of-life syndrome, POLS): эволюция концепции // Зоологический журнал. 2021. Т. 100. № 9. С. 969—983. DOI: 10.31857/S0044513421090117
- Высоцкий В.Г. Определение возраста у мухоловок-пеструшек *Ficedula hypoleuca* в период размножения // Труды Зоологического института АН СССР. 1989. Т. 197. С. 49—52.
- Гриньков В.Г. Условия стабильного поддержания фенотипической структуры популяции на примере изменчивости окраски брачного наряда у самцов мухоловки-пеструшки (*Ficedula hypoleuca* Pall.): Автореф. дис. канд. биол. наук. М.: МГУ, 2000. 24 с.
- Дольник В.Р. Ресурсы энергии и времени у птиц в природе // Труды Зоологического института РАН. 1995. Т. 179. С. 1—360.
- Ильина Т.А., Иванкина Е.В., Керимов А.Б. Роль социального фактора в освоении новой среды у большой синицы (*Parus major*) в условиях ограниченного пространства // Зоологический журнал. 2010. Т. 89. № 9. С. 1131—1138.
- Ильина Т.А., Киселева А.В., Беляков В.В., Еланская А.С., Паллак А.М., Уварова М.А., Устинова Д.А. Поведенческие типы у птиц и их выявление в природных условиях на примере мухоловки-пеструшки // Орнитология. 2022. Т. 46. С. 5—12. DOI: 10.56658/04747313\_2022\_46\_5
- Ильина Т.А., Крупицкий А.В., Бушуев А.В. Связь успешности межвидового выкармливания птенцов с шириной трофической ниши вида-реципиента у птиц-дуплогнезdnиков // Зоологический журнал. 2019. Т. 98. № 6. С. 649—664. DOI: 10.1134/S0044513419060072
- Керимов А., Иванкина Е., Шишкин В. Неустойчивый половой диморфизм и параметры размножения

- мухоловки-пеструшки // Орнитология. 1994. Т. 26. С. 13—27.
- Керимов А.Б., Роговин К.А., Иванкина Е.В., Бушуев А.В., Соколова О.В., Ильина Т.А. Специфический иммунитет и полиморфизм брачного наряда самцов мухоловки-пеструшки, *Ficedula hypoleuca* (Aves: Passeriformes) // Журнал общей биологии. 2012. Т. 73. № 5. С. 349—359.
- Котеров А.Н., Ушенкова Л.Н., Зубенкова Э.С., Калинин М.В., Бирюков А.П., Ласточкина Е.М., Молодцова Д.В., Вайнсон А.А. Сила связи. Сообщение 2. Градации величины корреляции // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64. № 6. С. 12—24. DOI: 10.12737/1024-6177-2019-64-6-12-24
- Минина М.А., Телегина Я.Р., Друзьяка А.В., Зотов А.Ю. Влияние условий раннего развития на формирование индивидуальных поведенческих характеристик у птенцов озерной чайки (*Larus ridibundus*) // Орнитология: история, традиции, проблемы и перспективы. Материалы Всероссийской конференции, посвященной 120-летию со дня рождения профессора Г. П. Дементьева. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2018. С. 246—253.
- Шилов И.А. Эколого-физиологические основы популяционных отношений у животных. М.: Изд-во Московского университета, 1977. 262 с.
- Шилов И.А. Экология. М.: Высшая школа. 2001. 512 с.
- Шилов И.А., Каменов Д.А., Маслов С.П. Значение основных свойств нервной системы в становлении иерархической структуры в однополых группах домовых мышей // Зоол. журн. 1974. Т. 43. № 10. С. 1548—1555.
- Bairlein F. Manual of field methods. European-African songbird migration network // Institut für Vogelforschung, Wilhelmshaven. 1995. 32 pp.
- Bates D., Mächler M., Bolker B., Walker S. Fitting linear mixed-effects models using lme4 // Journal of Statistical Software. 2015. V. 67. № 1. P. 1—48.
- Beckmann C., Biro P.A. On the validity of a single (boldness) assay in personality research // Ethology. 2013. V. 119. № 11. P. 937—947. DOI:10.1111/eth.12137
- Bell A.M., Hankison S.J., Laskowski K.L. The repeatability of behaviour: a meta-analysis // Animal behaviour. 2009. V.77. № 4. P. 771—783. DOI:10.1016/j.anbehav.2008.12.022
- Both C., Dingemanse N.J., Drent P.J., Tinbergen J.M. Reproductive success and Great Tit personalities // Natural Selection and Avian Personality in a Fluctuating Environment. 2003. P. 59—70.
- Burt H.E., Giltz M.L. Personality as a variable in the behavior of birds // The Ohio Journal of Science. 1973. V.73. № 2. P. 65—82.
- Bushuev A., Zubkova E., Tolstenkov O., Kerimov A. Basal metabolic rate in free-ranging tropical birds lacks long-term repeatability and is influenced by ambient temperature. // Journal of Experimental Zoology. 2021. V. 335. P. 668—677. DOI:10.1002/jez.2532
- Dingemanse N.J., Both C., Drent P.J., Van Oers K., Van Noordwijk A.J. Repeatability and heritability of exploratory behaviour in great tits from the wild // Animal behaviour. 2002. V. 64. № 6. P. 929—938. DOI:10.1006/anbe.2002.2006
- Dingemanse N.J., de Goede P. Winter dominance and avian personality in the wild // Natural selection and avian personality in a fluctuating environment. 2003. P. 33—46.
- Dingemanse N.J., Wolf M. Recent models for adaptive personality differences: a review // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2010. V. 365. № 1560. P. 3947—3958. DOI:10.1098/rstb.2010.0221
- Drent P.J., van Oers K., van Noordwijk A.J. Realized heritability of personalities in the great tit (*Parus major*) // Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences. 2003. V. 270. № 1510. P. 45—51. DOI: 10.1098/rspb.2002.2168
- Forsman A. Rethinking phenotypic plasticity and its consequences for individuals, populations and species // Heredity. 2015. V. 115. № 4. P. 276—284. DOI:10.1038/hdy.2014.92
- Garamszegi L.Z., Markó G., Herczeg G.A. Meta-analysis of correlated behaviours with implications for behavioural syndromes: mean effect size, publication bias, phylogenetic effects and the role of mediator variables // Evolutionary Ecology. 2012. V. 26. № 5. P. 1213—1235. DOI:10.1007/s10682-012-9589-8
- Garamszegi L.Z., Mueller J.C., Markó G., Szász E., Zsebök S., Herczeg G., Eens M., Török J. The relationship between DRD4 polymorphisms and phenotypic correlations of behaviors in the collared flycatcher // Ecology and evolution. 2014. V. 4. № 8. P. 1466—1479. DOI: 10.1002/ece3.1041
- Groothuis T.G., Carere C. Avian personalities: characterization and epigenesis // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2005. V. 29. № 1. P. 137—150. DOI:10.1016/j.neubiorev.2004.06.010
- Herborn K.A., Macleod R., Miles W.T., Schofield A.N., Alexander L., Arnold K.E. Personality in captivity reflects personality in the wild // Animal Behaviour. 2010. V. 79. № 4. P. 835—843. DOI:10.1016/j.anbehav.2009.12.026
- Houston A.I. Evolutionary models of metabolism, behaviour and personality // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2010. V. 365. № 1560. P. 3969—3975. DOI: 10.1098/rstb.2010.0161
- Kerimov A.B., Ilyina T.A., Ivankina E.V., Bushuev A.V., Sokolova O.V., Rogovin K.A. Melanin-based coloration and immunity in polymorphic population of pied flycatcher, *Ficedula hypoleuca* // Evolutionary ecology. 2018. V. 32. P. 89—111. DOI:10.1007/s10682-017-9926-z
- Kluen E., Brommer J.E. Context-specific repeatability of personality traits in a wild bird: a reaction-norm perspective // Behavioral Ecology. 2013. V. 24. № 3. P. 650—658. DOI:10.1093/beheco/ars221

- Kluen E., Kuhn S., Kempnaers B., Brommer J.E.* A simple cage test captures intrinsic differences in aspects of personality across individuals in a passerine bird // *Animal Behaviour*. 2012. V. 84. № 1. P. 279—284. DOI:10.1016/j.anbehav.2012.04.022
- Koolhaas J., Korte S., De Boer S., Van Der Vegt B., Van Reenen C., Hopster H., De Jong I.C., Ruis M.A.W., Blokhuis H.J.* Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1999. V. 23. № 7. P. 925—935.
- Kuznetsova A., Brockhoff P.B., Christensen R.H.B.* lmerTest package: tests in linear mixed effects models // *Journal of Statistical Software*. 2017. V. 82. № 13. P. 1—26. DOI:10.18637/jss.v082.i13
- Lüdecke D., Makowski D., Waggoner P., Patil I.* Performance: Assessment of Regression Models Performance. R package v. 0.6.0. 2020. [https://easystats.github.io/performance/egression models performance](https://easystats.github.io/performance/egression%20models%20performance).
- Lundberg A., Alatalo R.V.* The Pied Flycatcher. London: T. and A. D. Poyser, 1992. 267 p.
- Murren C.J., Auld J.R., Callahan H., Ghalambor C.K., Handelsman C.A., Heskell M.A., Kingsolver J.G., Maclean H.J., Masel J., Maughan H., Pfennig D.W., Relyea R.A., Seiter S., Snell-Rood E., Steiner U.K., Schlichting C.D.* Constraints on the evolution of phenotypic plasticity: limits and costs of phenotype and plasticity // *Heredity*. 2015. V. 115. № 4. P. 293—301. DOI:10.1038/hdy.2015.8
- Nakagawa S., Schielzeth H.* Repeatability for Gaussian and non-Gaussian data: a practical guide for biologists // *Biological Reviews*. 2010. V. 85. № 4. P. 935—956. DOI:10.1111/j.1469—185X.2010.00141.x
- Nakagawa S., Schielzeth H.A.* General and simple method for obtaining  $R^2$  from generalized linear mixed-effects models // *Methods in ecology and evolution*. 2013. V. 4. № 2. P. 133—142. DOI:10.1111/j.2041-210x.2012.00261.x
- Pusch E.A., Navara K.J.* Behavioral phenotype relates to physiological differences in immunological and stress responsiveness in reactive and proactive birds // *General and Comparative Endocrinology*. 2018. V. 261. P. 81—88. DOI:10.1016/j.ygcen.2018.01.027
- Quinn J.L., Cresswell W.* Personality, anti-predation behaviour and behavioural plasticity in the chaffinch *Fringilla coelebs* // *Behaviour*. 2005. V. 142. № 9—10. P. 1377—1402.
- Réale D., Reader S.M., Sol D., McDougall P.T., Dingemanse N.J.* Integrating animal temperament within ecology and evolution // *Biological reviews*. 2007. P. 82. № 2. P. 291—318. DOI:10.1111/j.1469—185X.2007.00010.x
- Sih A., Bell A.M., Johnson J.C., Ziemba R.E.* Behavioral syndromes: an integrative overview // *The Quarterly Review of Biology*. 2004. V. 79. № 3. P. 241—277.
- Stoffel M.A., Nakagawa S., Schielzeth H.* rptR: Repeatability estimation and variance decomposition by generalized linear mixed-effects models // *Methods in ecology and evolution*. 2017. V. 8. № 11. P. 1639—1644. DOI: 10.1111/2041-210X.12797
- Timm K., Tilgar V., Saag P.* DRD4 gene polymorphism in great tits: gender-specific association with behavioural variation in the wild // *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 2015. V. 69. № 5. P. 729—735. DOI: 10.1007/s00265-015-1887-z
- Van Oers C.H.J.* On the genetics of avian personalities: mechanism and structure of behavioural strategies in the great tit (*Parus major*): PhD Thesis. Utrecht: Universiteit van Utrecht, 2003. 136 pp.
- Van Oers K., Drent P.J., De Goede P., Van Noordwijk A.J.* Realized heritability and repeatability of risk-taking behaviour in relation to avian personalities // *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 2004. V. 271. № 1534. P. 65—73. DOI: 10.1098/rspb.2003.2518
- Van Oers K., Drent P.J., Dingemanse N.J., Kempnaers B.* Personality is associated with extrapair paternity in great tits, *Parus major* // *Animal Behaviour*. 2008. V. 76. № 3. P. 555—563. DOI:10.1016/j.anbehav.2008.03.011
- Van Oers K., Klunder M., Drent P.J.* Context dependence of personalities: risk-taking behavior in a social and a nonsocial situation // *Behavioral Ecology*. 2005. V. 16. № 4. P. 716—723. DOI:10.1093/beheco/ari045
- Verbeek M.E., Boon A., Drent P.J.* Exploration, aggressive behaviour and dominance in pair-wise confrontations of juvenile male great tits // *Behaviour*. 1996. V. 133. № 11—12. P. 945—963.
- Verbeek M.E., Drent P., De Goede P., Wiepkema P.* Individual behavioural characteristics and dominance in aviary groups of great tits // *Behaviour*. 1999. V. 136. № 1. P. 23—48.
- Vrublevska J., Krama T., Rantala M.J., Mierauskas P., Freeberg T.M., Krams I.A.* Personality and density affect nest defence and nest survival in the great tit // *Acta ethologica*. 2015. V. 18. P. 111—120. DOI: 10.1007/s10211-014-0191-7

## **Boldness as an Individual Trait of Behaviour in a Natural Population of Birds**

© 2024 Т. А. Илына\*<sup>#</sup>, А. В. Киселева\*, А. В. Бущев\*, Е. В. Ивankina\*\* and А. В. Керимов\*

\*Faculty of Biology, Department of Vertebrate Zoology, M. V. Lomonosov Moscow State University,  
Leninskiye Gory, 1, Bld 12, Moscow, 119234 Russia

\*\*S. N. Skladovsky Zvenigorod Biological Station of M. V. Lomonosov Moscow State University,  
P/O Shikhovo, Moscow Region, 143036 Russia

<sup>#</sup>E-mail: ilyina@mail.bio.msu.ru

Individual resoluteness during the resumption of feeding of nestlings was examined in tests involving the presentation of an unfamiliar object near the nests of the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) in a natural environment. Over the course of five breeding seasons, 229 individuals were tested, 41 of which were tested 2 to 4 times. Repeat testing of the same birds was conducted at different nests with intervals ranging from 3 to 1103 days (Med=367). We took into account the number and age of nestlings, nesting periods, the sex and age of the individual and its partner, the presence of molting, the intensity of nestling feeding, the behavior of the partner, as well as the presence of simultaneous bigamy in the male. We revealed a significant repeatability of test results over substantial time intervals ( $R=0.21$ ), indicating the individual's stability over time in response (boldness) to changing conditions in the natural environment.

*Keywords:* personality, boldness, novelty test, breeding period, pied flycatcher, *Ficedula hypoleuca*.

## ДИПЕПТИД *L*-КАРНОЗИН ( $\beta$ -АЛАНИЛ-*L*-ГИСТИДИН) – КРИОПРОТЕКТОР НЕРВНОЙ ТКАНИ НЕГИБЕРНИРУЮЩИХ ЖИВОТНЫХ

© 2024 г. А.А. Мокрушин

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 199034 Россия

E-mail: mok@inbox.ru

Поступила в редакцию 10.05.2023

После доработки 25.09.2023

Принята к публикации 25.09.2023

В работе исследовали криопротективные свойства дипептида *L*-карнозина ( $\beta$ -аланил-*L*-гистидин) на срезах обонятельной коры мозга крыс. Анализировали изменения активности *N*-метил-*D*-аспаратных рецепторов как наиболее уязвимых к действию криосохранения (КС), для этого экстраклеточно регистрировали НМДА-синаптический компонент возбуждающего постсинаптического потенциала (сокращенно — НМДА потенциалы). Срезы инкубировали с *L*-карнозином (20 мМ) в среде и замораживали с медленной скоростью (0.1°C/мин) до –10 °C и после КС (30 сут) отогревали с такой же скоростью (0.1°C/мин) до +37°C. Определяли эффективность криопротекции *L*-карнозина по изменениям амплитуд НМДА потенциалов после КС по сравнению до КС. Дипептид восстанавливал рН замораживающей среды (6.9, без *L*-карнозина) до оптимальных значений (7.3–7.4), способствовал дегидратации свободной воды из срезов после КС, ингибировал развитие глутаматной эксайтотоксичности в срезах. Полученные данные доказывают, что *L*-карнозин проявляет свойства нетоксичного эффективного криопротектора в нервной ткани теплокровных негиберирующих животных.

**Ключевые слова:** *L*-карнозин, срезы мозга, НМДА рецепторы, фокальные потенциалы, замораживание/отогревание, криосохранение.

**DOI:** 10.31857/S1026347024030064, **EDN:** VASIBN

Криосохранение (КС) — это перспективная биотехнология, которая заключается в использовании отрицательных температур для длительного и обратимого ингибирования метаболизма в клетках и тканях. В настоящее время методы КС используются в медицинских и исследовательских целях для хранения биологических материалов, включая клетки, ткани, особенно они востребованы в регенеративной и репродуктивной медицине и при создании криобанка трансплантатов (Giwa *et al.*, 2017).

В практическом плане при КС тканей и органов возникают проблемы, связанные с отсутствием надежных протоколов замораживания/отогревания и неоднородностью морфологической организацией различных тканей (Taylor *et al.*, 2019). Оптимальные результаты получаются с однородными клетками (кровь, сперма, ооциты), для которых применимы протоколы КС клеток (Whaley *et al.*, 2021).

Серьезные проблемы возникают при КС нервной системы, поскольку она морфологически гетерогенна: клетки, синапсы, рецепторные структуры на мембранах. Все они проявляют различную резистентность к действию замораживания/отогревания. Эти условия требуют соответствующего выбора

экспериментального объекта при разработке протоколов КС нервной ткани. Учитывая, что для клинки при трансплантации требуется интегрированная нервная структура, полагаем, что переживающие срезы мозга являются наилучшими экспериментальными объектами для исследования закономерностей КС теплокровных.

Преимуществами использования срезов мозга является то, что в них сохраняется цитоархитектоника ткани, из которой они изготовлены, взаимодействие клеток происходит как *in vivo*, а также реален контроль над составом внеклеточной среды. Наилучшим индикатором функционирования нейронной ткани является электрофизиологическое измерение синаптической активности (Cho *et al.*, 2007).

Наш опыт применения срезов мозга обонятельной коры крыс в исследовании процессов КС выявил определенные критические моменты изменений активности глутаматергических синапсов (Mokrushin, 2015; Мокрушин, 2016). Так, при медленных скоростях охлаждения срезов обонятельной коры мозга (0.1–0.125 °C/мин) активности НМДА (*N*-метил-*D*-аспарат) механизмов значительно редуцировались или блокировались. Увеличение скоростей замораживания/отогревания

(2,0, 4,0, 6,0, 9,0 °C/мин) приводило к необратимому ингибированию активности НМДА механизмов. Оптимальной глубиной замораживания срезов, как было установлено, являлась температура  $-10$  °C.

Результаты показали, что НМДА механизмы являются наиболее уязвимыми к действию факторов КС и их активность не восстанавливалась при отогревании срезов мозга до нормотермических значений, то есть развивались криоповреждения. Важно отметить, что НМДА механизмы являются ключевыми в системе глутаматергической медиаторной системы мозга. Нарушения их функционирования оказывают значительные эффекты не только на трансляцию сенсорных сигналов, но также и на развитие процессов научения, формирования энграмм памяти. Кроме того, расстройств в деятельности этих механизмов усиливают проявление патологических нейродегенеративных заболеваний (Traynelis, Cull-Candy, 1990; Obrenovitch, Urenjak, 1997).

Для сохранения активности клеток при КС применяют криопротекторы (КП). Они должны предотвратить криоповреждения клеточной мембраны и клеточных органелл в процессе КС. Однако высокая токсичность наиболее распространенных КП (диметилсульфоксид (ДМСО), этиленгликоль и пропиленгликоль) ограничивает/исключает их использование в протоколах КС, особенно для нервной ткани (Pichugin *et al.*, 2006; Hanslick *et al.*, 2009; Jacob, Torre, 2009; Yuan *et al.*, 2014).

Кроме отсутствия токсичных влияний на ткань, «идеальные» КП не должны влиять на метаболизм. Такие вещества могут быть природными метаболитами, например сахара, аминокислоты, органические кислоты.

В настоящей работе мы исследовали криопротективные свойства вещества эндогенного происхождения *L*-карнозина. *L*-карнозин ( $\beta$ -аланил-*L*-гистидин) — гидрофильный дипептид, синтезируемый ферментом карнозинсинтаза 1 (CARNS1) из аминокислот,  $\beta$ -аланина (синтезируется в печени) и *L*-гистидина (получаемый из пищи).

Дипептид обнаружен во всех тканях многих позвоночных (Boldyrev *et al.*, 2013). Однако распределение и клеточная локализация *L*-карнозина являются тканеспецифичными. Преобладающие концентрации *L*-карнозина (миллимолярный порядок) выявлены в сердечных и скелетных мышцах, а также в головном мозге (Boldyrev *et al.*, 2013). В отделах головного мозга распределение дипептида также неодинаково. Наибольшие уровни *L*-карнозина обнаружены в клетках обонятельной луковицы и обонятельной коры (1—2 мМ), тогда как концентрации *L*-карнозина в нейронах кортикальных структур головного мозга не превышают 0,1 мМ (Hipkiss *et al.*, 1998; Boldyrev *et al.*, 2013). Увеличенные концентрации *L*-карнозина в мышцах и нейронах обонятельных структур могут указывать на его протекторное действие, что станет очевидным при рассмотрении его эффектов на клеточно-молекулярном уровне.

Для характеристики *L*-карнозина важно отметить его катаболизм. При действии двух карнозиназ: карнозиндипептидазы 1 (CNDP1) и цитозольной карнозиндипептидазы 2 (CNDP2) — дипептид деградирует на  $\beta$ -аланин и *L*-гистидин (Lenney *et al.*, 1982, 1985).

Возвращаясь к протективным свойствам *L*-карнозина на молекулярно-клеточном уровне, следует отметить его плейотропные положительные свойства. Обнаружено, что *L*-карнозин действует как активный антиоксидант — ловушка активных форм кислорода (Kohen *et al.*, 1988; Babizhayev *et al.*, 1994; Boldyrev *et al.*, 2013). Он образует аддукты с альдегидными продуктами окисления липидов, не затрагивая мембраны клеток. Карнозин ингибирует процесс гликелирования и активно захватывает протоны, накапливающиеся при гликолизе (Pepper *et al.*, 2010).

В мышечных клетках *L*-карнозин снижает накопление лактата и, действуя как протонный буфер, препятствует процессу закисления (Stvolinski *et al.*, 1992). Протективная функция *L*-карнозина выявлена при его комплексообразовании с тяжелыми металлами, что способствует защите клеточных мембран (Boldyrev *et al.*, 2013; Hasanein, Felegari, 2017; Verezhnoy *et al.*, 2019).

Обнаружено, что *L*-карнозин модулирует глутаматергическую медиаторную систему и в микромолярных концентрациях активизирует АМПА- и НМДА-зависимые механизмы (Khama-Murad *et al.*, 2008). Апликация *L*-карнозина на нейроны до ишемии приводила к снижению числа их гибели и тормозила накопление внеклеточного глутамата после ишемии, т. е. дипептид проявлял нейропротективные эффекты на глутаматергические механизмы (Quyang *et al.*, 2016).

При анализе эффектов *L*-карнозина как потенциального КП в нервной системе следует рассмотреть его влияния на глутаматергические механизмы. Обнаружена колокализация глутамата и *L*-карнозина в пресинапсах нейронов обонятельной коры и луковицы (Sassoe—Pognetto *et al.*, 1993; Bonfanti *et al.*, 1999). При активации глутаматергических механизмов в синаптическое пространство выделяются оба вещества и, как можно полагать, увеличивают эффективность синаптической передачи, что, действительно, подтвердилось экспериментально. Апликация *L*-карнозина в микромолярных концентрациях активировала АМПА- и НМДА-зависимые механизмы в срезах обонятельной коры (Khama—Murad *et al.*, 2008). Во многих работах выявлен нейропротективный эффект *L*-карнозина на нервных клетках при ишемическом и геморрагическом инсультах. Защитный эффект дипептида наблюдался как в моделях *in vitro*, так и *in vivo* (Zemke *et al.*, 2005; Khama—Murad *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Bae, Majid, 2013; Quyang *et al.*, 2016; Стволинский и др., 2017; Lopachev *et al.*, 2017; Verezhnoy *et al.*, 2019).

На основании приведенных выше данных о протективных свойствах *L*-карнозина мы высказали гипотезу, что дипептид способен действовать как

КП в процессе длительного КС. Правомерность этой гипотезы усиливается тем, что *L*-карнозин эндогенного происхождения, обладает гидрофильными свойствами и, что особенно важно, нетоксичен.

Для экспериментальной проверки гипотезы были исследованы эффекты *L*-карнозина на срезах обонятельной коры мозга крыс по следующему плану: влияние на амплитудные характеристики НМДА-зависимых потенциалов; влияние на кислотно-щелочной баланс среды со срезом — буферные свойства; влияние *L*-карнозина на изменение содержания воды в срезах до и после КС; эффекты *L*-карнозина на развитие эксайтотоксичности при отогревании срезов после КС.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

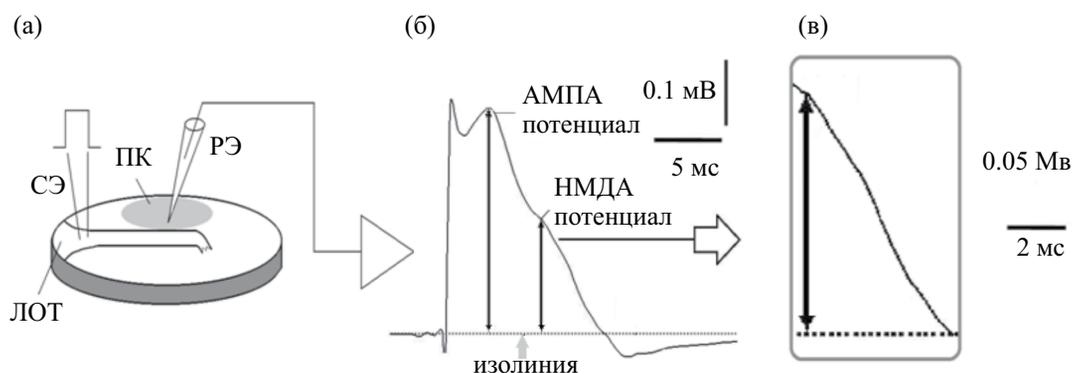
В опытах были использованы крысы-самцы линии Вистар массой 180—200 г. Исследования проведены на тангенциальных срезах обонятельной коры головного мозга крыс-самцов толщиной 400—500 мкм. Крыс декапировали резакон Н.А. Емельянова (Митюшов и др., 1986; Мокрушин, 1997) и готовили срезы обонятельной коры мозга. Срез переносили в стеклянный флакон объемом 1 мл с искусственным цереброспинальным раствором (ИЦР), составом (мМ): 124.0 NaCl; 5.0 KCl; 2.6 CaCl<sub>2</sub>; 1.24 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.2 MgSO<sub>4</sub>; 3.0 NaHCO<sub>3</sub>; 10.0 глюкозы; pH 7.3 при 37 °С. Флакон со срезом устанавливали в аппарат Варбурга (Германия) для преинкубации перед проведением КС.

Срез после преинкубации переносили в камеру электрофизиологической установки (Мокрушин, Боровиков, 2017), перфузировали ИЦР со скоростью

2.0 мл/мин и регистрировали НМДА потенциалы. При электрической стимуляции латерального обонятельного тракта (ЛОТ) в нормотермических условиях внеклеточно записывались фокальные потенциалы (ФП).

Основные морфологические компоненты среза и локализации электродов показаны на рис. 1а. ФП состоит из нескольких волн, которые отражают активность различных морфологических структур среза (рис. 1б). После артефакта раздражения регистрируется пресинаптическая волна, она свидетельствует об активности волокон ЛОТ. Вслед за ней регистрируются реакции постсинаптических глутаматергических ионотропных рецепторов — альфа-амино-3-гидрокси-5-метилизоксало-4-пропионовой кислоты (АМПА) и *N*-метил-D-аспартата (НМДА). В работе изучали изменения активностей только НМДА-зависимых механизмов в виде НМДА потенциалов (рис. 1в). При помощи специфического антагониста D-APV (50 мкМ) к НМДА рецепторам эти потенциалы были выявлены (Мокрушин, 1997; Mokrushin, Pavlinova, 2013).

НМДА потенциалы (мкВ) регистрировали стеклянными микроэлектродами, заполненными 1 М NaCl, с сопротивлением 1—5 МОм. Эти потенциалы возникали в ответ на электрические импульсы, подаваемые на ЛОТ от электростимулятора (ЭСУ-1, Россия) прямоугольной формы, длительностью 0.1 мс, интенсивностью 1—3 В и частотой 0.003 Гц. Далее потенциалы усиливали (НТО, Россия), оцифровывали аналого-цифровым прибором (Е 20—10, Россия) и обрабатывали с помощью компьютерной программы “Анализ электрической активности нейронов” (Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Россия).



**Рис. 1.** Изучение криопротективных свойств *L*-карнозина на срезах обонятельной коры мозга крыс (а) при измерении амплитуд НМДА потенциалов (б, в). а — схема тангенциального среза обонятельной коры мозга крыс с основными морфологическими структурами и локализациями стимулирующего и регистрирующего электродов: ЛОТ — латеральный обонятельный тракт, СЭ — стимулирующий электрод, ПК — пириформная кора, РЭ — регистрирующий электрод, б — фокальный потенциал, в срезе на электрическую стимуляцию ЛОТ с указанием постсинаптических компонентов: ранний АМПА потенциал и поздний НМДА потенциал (мкВ), в — в увеличенном масштабе НМДА потенциал — индикатор активности НМДА-зависимых механизмов. В работе исследовались только модификации НМДА потенциалов при действии *L*-карнозина при КС. Пунктирная линия, изолиния — потенциал среза в состоянии покоя; вертикальная стрелка указывает метод измерения амплитуд НМДА потенциала во временной точке 8 мс от артефакта стимуляции. Калибровка — как указано.

pH-метр Seven Compact S220 (Mettler Toledo, США) был применен для определения pH ИЦР до и после КС с точностью 0.1. Измерение температуры среды со срезами до и после КС производил прибором “Измеритель пид-регулятор ТРМ12” (Россия).

Изменение свободной воды в срезах определяли с помощью измерения весов на торсионных весах ВТ-500 (Россия). До КС срезы взвешивали, и эти значения были контрольными и обозначались как  $M_k$  (мг). После КС срезы высушивали в сушильном шкафу при 85 °С в течение 5 ч, охлаждали в эксикаторе, повторно взвешивали, и значения обозначались как  $M_{вс}$  (мг). Содержание воды в срезах определялось по формуле:  $S_v = M_k - M_{вс} / M_{вс}$  (мг), где:  $S_v$  — содержание воды в срезах после КС,  $M_k$  — вес контрольных срезов до КС,  $M_{вс}$  — вес высушенных срезов после КС.

Дизайн экспериментов был следующим. Срез помещался в проточную камеру электрофизиологической установки (Мокрушин, Боровиков, 2017), и в нем регистрировали амплитуду НМДА потенциалов (мкВ) в течение 20 мин. Цифровые значения амплитуд НМДА потенциалов считали контрольными до КС и принимали за 100 %. Затем срезы перфузировали ИЦР с тем же солевым составом, но с *L*-карнозином (20 мМ, 20 мин) и регистрировали НМДА потенциалы. Затем срезы замораживали в ИЦР с медленной скоростью (0.1 °С/мин) до -10 °С и хранили в морозильнике термостата ThermoStat plus (Eppendorf, Германия). Через 30 сут КС срезы отогревали до +37 °С с медленной скоростью (0.1 °С/мин). Вновь регистрировали НМДА потенциалы и выражали в % по отношению к значениям до КС.

Химические компоненты для приготовления инкубационных растворов были приобретены в фирме “Химреактив” (Россия), *L*-карнозин (Sigma, США).

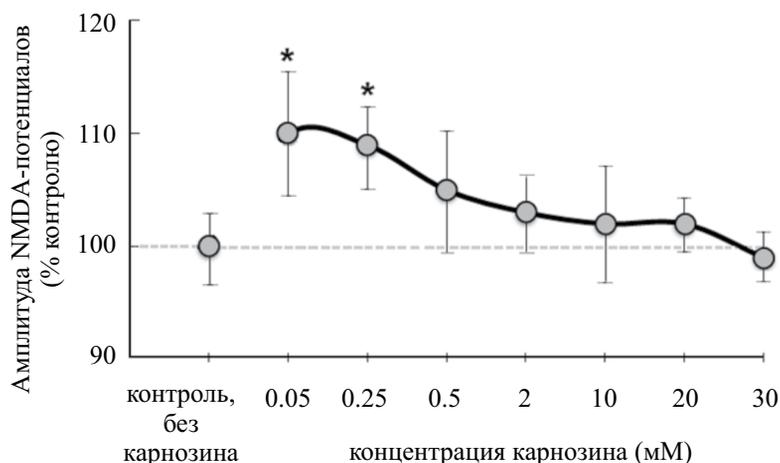
Достоверность изменений амплитуд НМДА потенциалов осуществлялись непараметрическим параметром Вилкоксона–Манна–Уитни ( $U$ -критерия). Уровень статистической значимости составлял  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В начале исследований КС срезов были протестированы нейротропные эффекты *L*-карнозина на амплитуду НМДА потенциалов. Такие данные требуются, чтобы выявить концентрацию *L*-карнозина, при которой будут получены стабильные протективные эффекты. При выборе концентрации дипептида мы исходили из того, что концентрация *L*-карнозина в обонятельной луковице коры и обонятельной коры составляет 1–2 мМ (Boldyrev *et al.*, 2013), а также что исследователи применяют *L*-карнозин в концентрациях 0.05–2.0 мМ. В наших опытах диапазон экзогенно апплицируемого дипептида был 0.05–30.0 мМ (рис. 2). При аппликации *L*-карнозина в концентрациях 0.05–0.5 мМ наблюдалось увеличение амплитуды НМДА потенциалов на 8–10 % по сравнению с контролем. При концентрациях *L*-карнозина 20–30 мМ происходило статистически недостоверное увеличение амплитуд НМДА потенциалов по сравнению с контролем (рис. 2).

Важно отметить, что полученные данные указывают на отсутствие каких-либо токсических влияний *L*-карнозина на активность НМДА механизмов, что усиливает свойство дипептида как КП.

Далее было испытано влияние *L*-карнозина на поддержание кислотно-щелочного баланса среды, в которой проводилось КС срезов. Это необходимо, поскольку, как было обнаружено, одной из причин криоповреждения НМДА механизмов является увеличение кислотности среды до pH 6.5 (вместо



**Рис. 2.** Влияние аппликации *L*-карнозина в разной концентрации на амплитуду НМДА потенциалов в срезах обонятельной коры крысы. Ось абсцисс — шкала условная. Разные концентрации *L*-карнозина испытывались на отдельной группе срезов ( $n = 12$ ). Изменения амплитуд НМДА потенциалов по отношению к значениям до КС (контроль) оценивали непараметрическим  $U$ -критерием Вилкоксона–Манна–Уитни,  $p \leq 0.05$  (\*).

pH 7.2—7.4 в норме) и блокада НМДА потенциалов (Мокрушин, 2022). Для этого срезы инкубировались в ИЦР (20 мин, +37°C) с *L*-карнозином (20 мМ).

*L*-карнозин до КС не оказывал воздействия на pH ИЦР. После КС отмечалось возрастание pH до 7.4 (рис. 3(а)), но оно было в диапазоне pH оптимальным для НМДА механизмов (pH 7.2—7.4 — на рис. 3(а) отмечено серым фоном).

Добавление дипептида в ИЦР не оказывало влияние на амплитуду НМДА потенциалов до КС (рис. 3(б), «карнозин 20 мМ»). После КС с *L*-карнозином амплитуда НМДА потенциалов незначительно снижалась, но достоверно по сравнению до КС с *L*-карнозином и без него (рис. 3(б), «карнозин 20 мМ после КС»). Следовательно, *L*-карнозин модифицирует pH ИЦР в процессе КС и таким способом проявляет свойства эффективного регулятора протонов в качестве КП.

Одной из ключевых характеристик КП является дегидратация свободной воды из клеток для снижения криоповреждения клеточных мембран. Поэтому в следующей серии экспериментов мы регистрировали изменения содержания воды (набухание) в срезах после КС с использованием *L*-карнозина. Важным условием опытов было использование медленной скорости 0.1 °C/мин при замораживании и последующего отогревания.

После КС в контрольных опытах без применения *L*-карнозина наблюдалось увеличение веса срезов на 20±7% (рис. 4(а), «после КС без карнозина»), что свидетельствует о возрастании гидратации клеток срезов. В этих условиях были оценены активности НМДА механизмов, и для этого были измерены амплитуды НМДА потенциалов. Оказалось, что они значительно снижались и составляли 5±1% по сравнению с контрольными значениями 100±10% до КС

( $p \leq 0.05$ ,  $U = 7$ ,  $n = 12$ ) (рис. 4(б), «после КС без карнозина»).

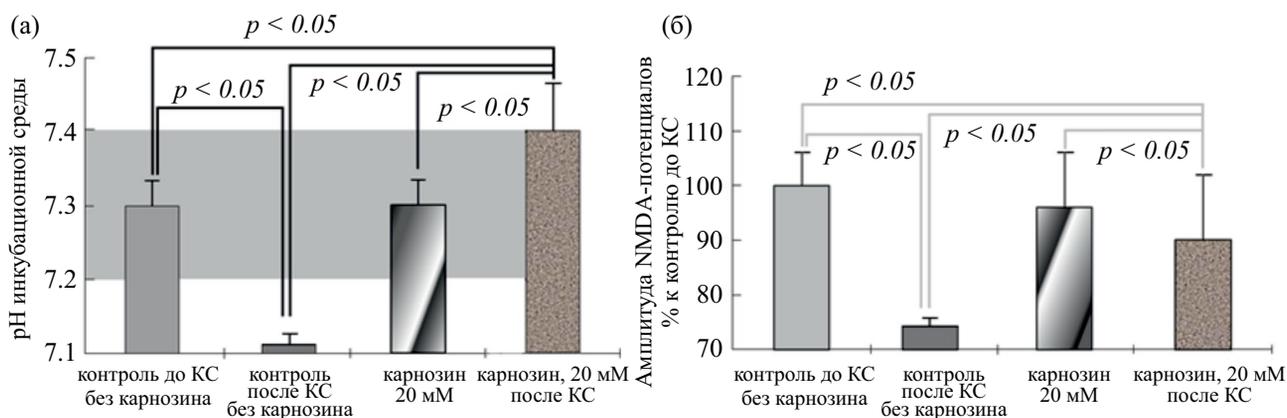
Для снижения гидратации (набухания) клеток срезов они инкубировались с *L*-карнозином в ИЦР до КС (рис. 4(а)). После КС без *L*-карнозина вес срезов возрастал (121±7% против 100% в контроле,  $p \leq 0.05$ ,  $U = 7$ ,  $n = 16$ ) (рис. 4(а)). Преинкубация срезов с *L*-карнозином приводила к тому, что их веса статистически не отличались от контроля: 108±6% против 100% в контроле,  $p \geq 0.05$ ,  $U = 7$ ,  $n = 16$  (рис. 4(а)).

Такие изменения гидратации срезов в присутствии *L*-карнозина способствовали сохранению НМДА потенциалов после КС (рис. 4(б), «после КС *L*-карнозин 20 мМ»). Амплитуда НМДА потенциалов до КС составляла в контроле 100±11%, а после КС была 93±8%. Статистически эти значения не отличались от значений до КС ( $p \leq 0.05$ ,  $U = 27$ ,  $n = 12$ ).

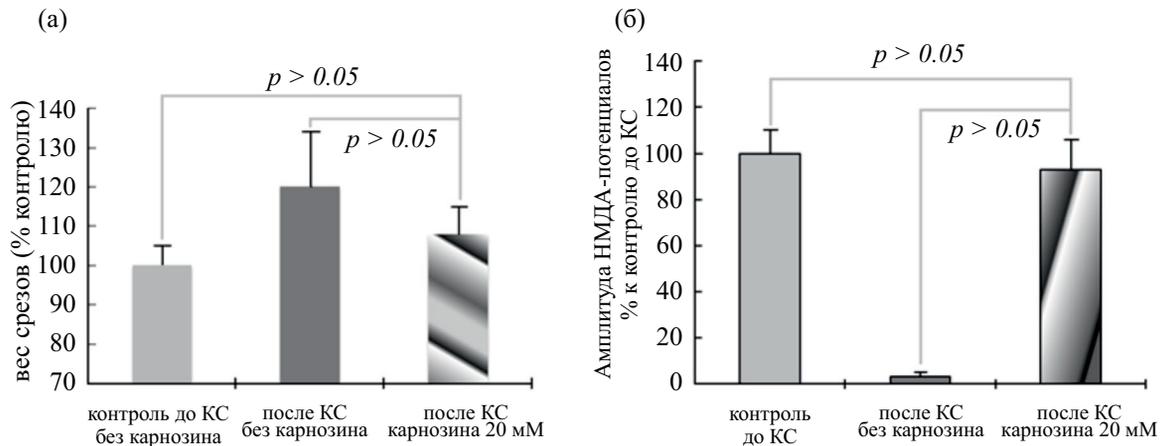
Эти данные указывают, что *L*-карнозин индуцировал выход свободной воды из срезов как при их замораживании, так и при отогревании. Такие процессы создают благоприятные условия для сохранения активности НМДА механизмов в процессе КС.

Полученные данные доказывают, что *L*-карнозин способствовал выходу свободной воды из срезов в процессе КС. Индуцированная дегидратация дипептидом содействовала сохранению активности НМДА механизмов в процессе КС. Это доказывает криопротективный характер *L*-карнозина.

Известно, что при действии стрессорных факторов на биологические объекты развиваются стресс-реакции, которые могут иметь негативные последствия для их последующего функционирования. В нервной системе развивается эксайтотоксичность, приводящая к гибели нейронов и впоследствии — всей нейросети. Исходя из этих сведений, мы испытали эффекты *L*-карнозина в процессе отогревания



**Рис. 3.** Воздействия преинкубации срезов в контроле без *L*-карнозина и с *L*-карнозином (20 мМ) на кислотно-щелочной уровень (pH) ИЦР до и после окончания КС (а), серым фоном — оптимальные диапазоны pH (pH 7.2—7.4), при которых поддерживаются амплитуды НМДА потенциалов,  $n = 7$ . Эффекты преинкубации срезов в контроле без *L*-карнозина и с *L*-карнозином (20 мМ) на модификацию амплитуд НМДА потенциалов до и после КС (б), достоверности различий значений pH замораживающего раствора (*L*-карнозин 20 мМ после КС) по сравнению со значениями до КС (контроль до КС без *L*-карнозина) определяли непараметрическим  $U$ -критерием Вилкоксона—Манна—Уитни,  $n = 7$ .



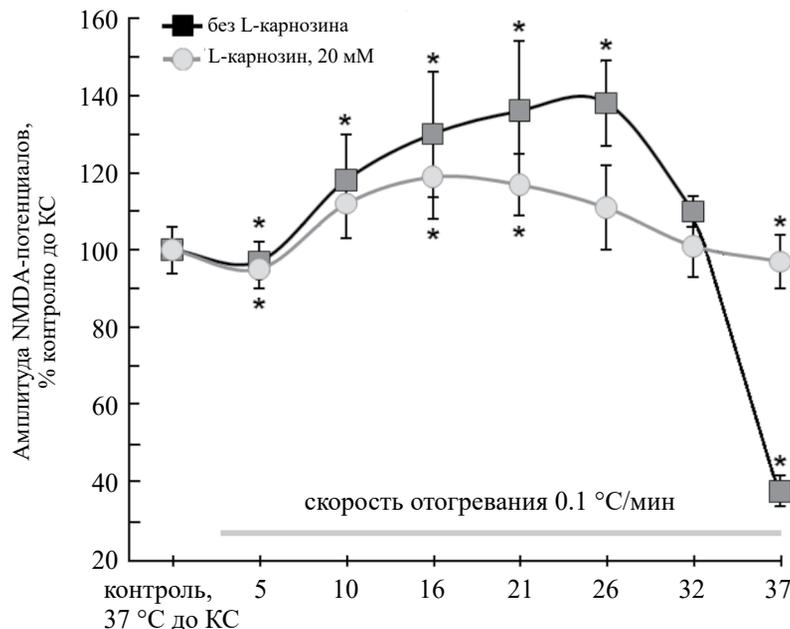
**Рис. 4.** Изменения содержания свободной воды (набухание — вес срезов, мг) в срезах под влиянием *L*-карнозина (20 мМ) до и после КС (а),  $n = 5$ . Эффекты набухания среза под влиянием *L*-карнозина (20 мМ) на изменения амплитуд НМДА потенциалов до и после КС (б). Различия амплитуд НМДА потенциалов по сравнению со значениями до КС («контроль до КС») и после КС («без карнозина» и после КС с «карнозином, 20 мМ») определяли непараметрическим *U*-критерием Вилкоксона–Манна–Уитни,  $n = 5$ .

срезов и надеялись получить ответ о его протективных эффектах от действия факторов эксайтотоксичности при КС.

Вначале были изучены изменения НМДА потенциалов без применения *L*-карнозина. В результате проведенных опытов было обнаружено, что амплитуда НМДА потенциалов менялась куполовидно при отогревании срезов (рис. 5, «кривая без

*L*-карнозина»). Амплитуды НМДА потенциалов существенно увеличивались в диапазоне температур от +21 °С до +26 °С ( $137 \pm 4\%$  и  $139 \pm 5\%$  соответственно). Далее происходил спад амплитуд НМДА потенциалов и, при +37 °С составляла  $37 \pm 4\%$  от контрольного уровня до КС (рис. 5).

Преинкубация срезов до КС с *L*-карнозином в ИЦР, так же как и без него, сопровождалась



**Рис. 5.** Тестирование *L*-карнозина (20 мМ) на возникновение эксайтотоксичности в срезах мозга в процессе отогревания после КС. По оси абсцисс — температуры раствора, при которых проводились измерения амплитуд НМДА потенциалов, шкала неравномерная,  $n = 9$ . Скорость отогревания срезов — 0.1 °С/мин. Остальные обозначения — на рисунке. Различия амплитуд НМДА потенциалов по отношению к значениям до КС (контроль) определяли непараметрическим *U*-критерием Вилкоксона–Манна–Уитни,  $p \leq 0.05$  (\*).

сохранением куполовидной формы кривой модификаций амплитуд НМДА потенциалов, но их характер был иной (рис. 5, кривая «L-карнозин, 20 мМ»). Максимумы амплитуд НМДА потенциалов находились в диапазоне температур от +16°C до +21°C и составляли  $120 \pm 5\%$  и  $118 \pm 7\%$  соответственно. Продолжающееся отогревание срезов (от +26°C до +37°C) сопровождалось плавным снижением значением амплитуд, и при +37°C они не отличались от контрольных значений до КС (рис. 5).

Полученные результаты указывают на гиперактивацию НМДА механизмов без L-карнозина, что свидетельствует о развитии эксайтотоксичности без применения L-карнозина. Дипептид ингибировал развитие гиперактивации НМДА механизмов и тем самым протектировал активность этих механизмов.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы впервые представили характеристики L-карнозина как КП для нервной ткани в процессе длительного КС теплокровных негипернующих животных. Для того чтобы выявить криопротективные свойства L-карнозина, мы исследовали его эффекты на сохранение активностей НМДА-зависимых механизмов как наиболее уязвимых к действию длительного КС.

Были изучены эффекты L-карнозина как потенциального КП в четырех аспектах: влияние на амплитудные характеристики НМДА потенциалов срезов мозга; влияние на кислотно-щелочной баланс среды со срезом — буферные свойства; влияние L-карнозина на содержание воды в срезах до и после КС; эффекты L-карнозина на развитие эксайтотоксичности при отогревании срезов после КС. Необходимость такого плана работ была выработана в ходе предыдущих исследований КС срезов мозга крыс.

Главным требованием любого химического вещества, применяемого в качестве КП, является отсутствие или минимальная токсичность. По сравнению с диметилсульфоксид (ДМСО), который является «золотым стандартом» КП, установлено, что он токсичен для разных типов живых тканей (Awan *et al.*, 2020). При испытаниях ДМСО на нервных клетках в процессе КС он оказался наихудшим в ряду других КП (Пичугин, 2013).

L-карнозин, в отличие от ДМСО и других КП, имеет бесспорные достоинства. Он эндогенного происхождения и, как показали исследования, *in vivo* не токсичен (Caruso, 2022). Дипептид обладает высокой биосовместимостью с окружающими тканями. В организме он под действием карнозина распадается на  $\beta$ -аланил и L-гистидин, которые вовлекаются в участие в других процессах. Первая из них включается в состав многих белковых молекул, в печени она трансформируется в глюкозу. L-гистидин — незаменимая аминокислота, содержится в молекуле гемоглобина, используется в синтезе

гистамина, проявляет протективные свойства при восстановлении поврежденных тканей. При недостатке этой аминокислоты отмечены ухудшение когнитивных способностей, анемия. В срезах обонятельной коры L-карнозин не влиял на амплитуду НМДА потенциалов при концентрациях, превышающих значения *in vivo*.

При обсуждении результатов исследований КС важно отметить обязательный прием удаления токсичных КП из замораживающей среды при отогревании, который часто используется в клинике. Однако, как показали исследования, этот прием может нанести дополнительное повреждение структур ткани (Elliott *et al.*, 2017; Dlundla *et al.*, 2018). В наших исследованиях L-карнозин не удалялся из ИЦР при отогревании, что не препятствовало сохранению активности НМДА-зависимых механизмов после КС.

Одним из повреждающих факторов при КС является изменение кислотно-щелочного баланса ИЦР. Нами было обнаружено, что при отогревании ИЦР со срезом закислялся до pH 6.5 и при этих значениях активность НМДА-зависимых механизмов необратимо блокировалась (Мокрушин, 2022). Учитывая, что L-карнозин обладает буферными свойствами (Boldyrev *et al.*, 2013), мы проверили возможность дипептида регулировать кислотно-щелочной баланс в процессе КС. В результате проведенных исследований было обнаружено, что L-карнозин после КС оптимизировал кислотно-щелочной баланс с pH 6.9 до pH 7.3—7.4 ИЦР и способствовал сохранению активности НМДА-зависимых механизмов.

Общепринято считать, что одним из защитных механизмов КП является способность к дегидратации (вытеснению молекул воды из клетки). Известно, что свободная вода в живых тканях является причиной разрушения клеточных мембран кристаллами льда, как в процессе замораживания, так и при отогревании. Для уменьшения вероятности образования внутриклеточного льда вода должна покидать клетку при понижении температуры (Mazur, 1963).

Установлено, что этот процесс зависит от скорости замораживания. Медленные скорости ( $< 1^\circ\text{C}/\text{мин}$ ) способствуют дегидратации клеток и предотвращают образование кристаллов льда внутри клеток. Напротив, максимальная вероятность формирования кристаллов возникает при высоких скоростях, и эти условия отражаются на выживаемости клетки по закономерности Мазура (Mazur, 1970): скорость охлаждения пропорциональна вероятности образования внутриклеточного льда и обратно пропорциональна выживаемости клетки.

Мы протестировали «способность» L-карнозина к дегидратации свободной воды из срезов при медленной скорости охлаждения ( $0.1^\circ\text{C}/\text{мин}$ ). В результате было выявлено, что L-карнозин стимулировал дегидратацию свободной воды из срезов после КС и, что особенно важно, помогал сохранению амплитуды НМДА потенциалов после КС. Отметим, что без L-карнозина амплитуды НМДА потенциалов

были редуцированы на 95 % до КС. Таким образом, удалось выявить, что комбинированное применение медленной скорости замораживания (0.1 °C/мин) и добавление в среду *L*-карнозина способствовало сохранению НМДА-зависимых механизмов. Вероятный протективный механизм *L*-карнозина как внутриклеточного КП является его взаимодействие с молекулами воды с образованием водородных связей. Температура замерзания воды снижается, и меньше молекул воды доступно для взаимодействия друг с другом для образования кристаллов льда (Mandumpal *et al.*, 2010).

Криозащитные вещества подразделяются на две основные категории, а именно: проникающие и непроникающие агенты, которые защищают клетки с помощью различных механизмов (Matsumura *et al.*, 2021).

К непроникающим КП относят олигосахариды: наиболее часто используют сахарозу, трегалозу, поливинилпирролидон, раффинозу, полиэтиленгликоль (Eoglu, 2010; Bartolac *et al.*, 2018).

В отличие от непроникающих КП, *L*-карнозин является проникающим КП, поскольку он переносится через мембраны белками из семейства протонно-связанных олигопептидных переносчиков (POT), а также белков SLC15 (Matsumura *et al.*, 2021).

Сравним протективные свойства *L*-карнозина и часто используемой в качестве КП трегалозы. Молярные массы этих веществ примерно одинаковы: карнозин — 226.3 г/моль, трегалоза — 342.296 г/моль. Трегалоза, природный нетоксичный дисахарид, хорошо зарекомендовала себя при КС различных типов клеток. Однако она с трудом проходит через мембраны клеток. Для усиления криопротективного эффекта ее необходимо доставлять в клетки с помощью различных стратегий (Eoglu *et al.*, 2000, 2002), которые могут нарушить нормальное функционирование мембран нервных клеток, синапсов и внутриклеточных органелл.

При анализе полученных данных о криопротективных свойствах *L*-карнозина была использована концентрация *L*-карнозина (20 мМ), десятикратно превышающая его содержание в обонятельной луковице (1—2 мМ). При исследовании эффектов аппликации *L*-карнозина на амплитуду НМДА потенциалов в нормотермических условиях мы обнаружили, что малые концентрации дипептида (0.05—0.5 мМ) вызывали увеличение амплитуд по сравнению с большими (10—30 мМ). Этот феномен относится к парадоксальным эффектам действия малых и сверхмалых доз биологически активных веществ, которые наблюдаются для гормонов и пептидов (Долгов *и др.*, 2003). Интерпретации этих эффектов неоднозначны. Так, полагают, что такие эффекты связаны с адаптационными реакциями клеток, которые отвечают не на величину действующей концентрации, а на изменения концентрации вещества в малых и сверхмалых дозах (Сазонов, Зайцев, 1992). Другие исследователи приходят к выводу, что для достижения эффекта

достаточно, чтобы до клеток доходили самые “быстрые” молекулы действующего вещества из общего распределения, а не все молекулы (Бурлакова *и др.*, 1990). И. П. Ашмарин и сотрудники сформировали представление об основных механизмах для реализации эффектов сверхмалых концентраций веществ: а) системы каскадные, амплифицирующие сигнал; б) собирательные, “отлавливающие” системы; в) накопители и транспортеры сигнальных молекул; г) супераффинные рецепторы (Ашмарин *и др.*, 1996).

В контексте исследований *L*-карнозина в качестве КП мы на начальных этапах применяли малые концентрации *L*-карнозина (0.05—0.5 мМ), надеясь получить надежные криопротекторные эффекты НМДА-зависимых механизмов после КП, однако они не были выявлены.

Для получения надежного криопротективного эффекта мы полагали, что *L*-карнозин действует не только как проникающий, но и как внешний КП. Были приняты во внимание обменные процессы *L*-карнозина. Дипептид во внеклеточной среде распадается под действием карнозиндипептидазы 1 (CNDP1) и цитозольной карнозиндипептидазы 2 (CNDP2) (Teufel *et al.*, 2003). Как меняется активность этих ферментов в срезах во время замораживания/отогревания, неизвестно. Поэтому для повышения эффективности криопротективных свойств *L*-карнозина была увеличена его концентрация до 20 мМ.

Одной из причин криоповреждения НМДА механизмов при действии КС является развитие глутаматной эксайтотоксичности. Этот процесс возникает в результате гиперактивации глутаматных ионотропных АМПА и НМДА рецепторов при действии на них глутамата и индуцирует развитие нейротоксических процессов (Szydłowska, Tymianski, 2010; Mehta *et al.*, 2013). Установлено, что эксайтотоксичность является общим компонентом в механизмах ишемии и гипотермии (Vincent, Mülle, 2009; Warren *et al.*, 2012; Mehta *et al.*, 2013; Namura *et al.*, 2013).

На основании приведенных выше данных можно предполагать, что *L*-карнозин, выполняя функцию КП, должен проявлять протективные свойства при развитии глутаматной токсичности. Для получения ответа на этот вопрос мы исследовали динамику изменений амплитуд НМДА потенциалов в процессе отогревания срезов после КС при действии дипептида.

В контрольных опытах без использования *L*-карнозина амплитуда НМДА потенциалов изменялась двухфазно. В первой фазе в диапазоне температур от +21 °C до +26 °C амплитуды НМДА потенциалов достигали максимальных значений. Эти данные указывают на гиперактивацию НМДА-зависимых механизмов и развитие процесса эксайтотоксичности. Во второй фазе отогревания срезов происходило резкое снижение амплитуд НМДА потенциалов, и при +37 °C она составила лишь одну треть от значений до КС, что свидетельствует об активации глутаматных рецепторов, притоке избытка

ионов кальция в клетки и их эксайтотоксической гибели (Warren *et al.*, 2012).

Добавление *L*-карнозина (20 мМ) в ИЦР сопровождалось кратковременным небольшим увеличением амплитуд НМДА потенциалов в диапазоне температур от +16°C до +21°C, но их значения были меньше, чем без *L*-карнозина. При достижении +37 °C их значения не отличались от уровня до КС. Следовательно, дипептид проявляет еще один значительный, особенно значимый, криопротективный эффект — ингибирует развитие глутаматной эксайтотоксичности в процессе КС.

Итак, проведенные исследования доказывают, что *L*-карнозин является нетоксичным КП теплокровных негибернирующих животных. *L*-карнозин оптимизировал рН замораживающего раствора после КС. Он способствовал удалению свободной воды из срезов; блокировал глутаматную эксайтотоксичность.

Для нервной системы теплокровных результаты применения *L*-карнозина как КП получены впервые как в России, так и за рубежом. Вместе с тем планируются дальнейшие исследования по изучению криопротективных свойств *L*-карнозина. Одним из направлений работ является увеличение биодоступности *L*-карнозина и времени его активности в тканях с использованием селективных ингибиторов карнозиназа (Qiu *et al.*, 2019). Будут предприняты усилия для получения подобного эффекта с применением анзерина с эквивалентными физиологическими функциями *L*-карнозина (Boldyrev *et al.*, 2013). Установлено, что этот аналог не расщепляется карнозиназой, которая в большой концентрации содержится в сыворотке крови человека и значительно снижает биодоступность *L*-карнозина (Kubotuga *et al.*, 2009).

Планируется исследовать криопротективные свойства новосинтезированных «гибридных» молекул липоил-карнозин, аспероил-карнозин (Институт мозга), которые также устойчивы к гидролизу карнозиназой. Все эти и другие исследования будут направлены для создания надежного криобанка нервной ткани и использования в клинике для трансплантации.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор признателен Г. П. Смирновой за помощь в проведении экспериментов и С. Е. Боровикову за техническую помощь в настройке и обслуживании электрофизиологической установки.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Протокол исследования на животных одобрен Этическим комитетом Института физиологии им. И. П. Павлова РАН (шифр протокола № 08/10, дата утверждения — 8 октября 2020 г.).

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019—2030), тема 65.1 «Исследование интегративных механизмов развития адаптивных и патологических состояний мозга при экстремальных воздействиях». 0134-2019-0002.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Как автор данной работы, я заявляю, что у меня нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ашмарин И.П., Каразеева Е.П., Лелекова Т.В. Проблемы эффективности ультрамалых доз и концентраций эндогенных и экзогенных веществ // Нейроиммунология, эпидемиология и интерферонология рассеянного склероза. СПб. 1996. С. 29—34.
- Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Худяков И.В. Воздействие химических агентов в сверхмалых дозах на биологические объекты // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1990. № 2. С. 184—193.
- Долгов Г.В., Куликов С.В., Легеца В.И., Калинин В.В., Морозов В.Г., Смирнов В.С., Сосякин А.Е. Клиническая фармакология Тимогена. СПб.: Наука. 2003. 106 с.
- Митюшов М.И., Емельянов Н.А., Мокрушин А.А. Переживающий срез мозга как объект нейрофизиологического и нейрхимического исследования. Л.: Наука. 1986. 127 с.
- Мокрушин А.А. Пептид-зависимые механизмы нейрональной пластичности в обонятельной коре: Дис. д-ра биол. наук. Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН. СПб. 1997. 397 с.
- Мокрушин А.А. Эффекты глубокого замораживания и отогревания на ионотропные глутаматергические рецепторные механизмы *in vitro* // Бюлл. экспер. биол. мед. 2016. Т. 161. С. 36—42.
- Мокрушин А.А., Боровиков С.Е. Установка для изучения гипотермических эффектов на переживающих срезах мозга теплокровных // Междунар. журн. прикл. фундам. исслед. 2017. Т. 2. С. 214.
- Мокрушин А.А. Улучшение кислотно-щелочного состава среды для длительного и обратимого криосохранения срезов мозга крыс // Цитология. 2022. Т. 64. С. 96—102. doi: 10.31857/S0041377122010084
- Пичугин Ю.И. Теоретические и практические аспекты современной криобиологии. Москва. 2013. С. 60—62.
- Сазонов Л.А., Зайцев С.В. Действие сверхмалых доз ( $10^{-18}$ — $10^{-14}$  М) биологически активных веществ: общие закономерности, особенности и возможные механизмы // Биохимия. 1992. Т. 57. С. 1443—1460.

- Стволинский С.Л., Федорова Т.Н., Девятов А.А., Медведев О.С. Нейропротективное действие карнозина в условиях экспериментальной фокальной ишемии/реперфузии головного мозга // Журнал неврологии и психиатрии. 2017. Т. 12. С. 60—64. doi: 10.17116/jnervo201711712260-64
- Awan M., Buriak I., Fleck R., Fuller B., Goltsev A. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? // Regen. Med. 2020. V. 15. P. 1463—1491. doi: 10.2217/rme-2019-0145.
- Babizhayev M.A., Seguin M.C., Gueyne J., Evstigneeva R.P., Ageyeva E.A. L-carnosine (beta-alanyl-L-histidine) and carbinine (beta-alanylhistamine) act as natural antioxidants with hydroxyl-radical-scavenging and lipid-peroxidase activities // Biochem J. 1994. V. 304 (Pt 2). P. 509—516. doi: 10.1042/bj3040509.
- Bae O., Majid A. Role of histidine/histamine in carnosine-induced neuroprotection during ischemic brain damage // Brain Res. 2013. V. 1527. P. 246—254. doi: 10.1016/j.brainres.2013.07.004.
- Bartolac L.K., Lowe J.L., Koustas G., Grupen C.G. Effect of different penetrating and non-penetrating cryoprotectants and media temperature on the cryosurvival of vitrified in vitro produced porcine blastocysts // Anim. Sci. J. 2018. V. 89. P. 1230—1239. doi: 10.1111/asj.12996.
- Berezhnoy D.S., Stvolinsky S.L., Lopachev A.V., Kulikova O.I., Abaimov D.A., Fedorova T.N. Carnosine as an effective neuroprotector in brain pathology and potential neuromodulator in normal conditions // Amino Acids. 2019. V. 51. P. 139—150. doi: 10.1007/s00726-018-2667-7.
- Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine // Physiol. Rev. 2013. V. 93. P. 1803—1845. doi: 10.1152/physrev.00039.2012.
- Bonfanti L., Peretto P., De M.S., Fasolo A. Carnosine-related dipeptides in the mammalian brain // Prog. Neurobiol. 1999. V. 59. P. 333—353. doi: 10.1016/s0301-0082(99)00010-6.
- Caruso G. Unveiling the hidden therapeutic potential of carnosine, a molecule with a multimodal mechanism of action: a position paper // Molecules. 2022. V. 27. P. 1—14. doi: 10.3390/molecules27103303.
- Cho S., Wood A., Bowlby M.R. Brain Slices as Models for Neurodegenerative Disease and Screening Platforms to Identify Novel Therapeutics // Current Neuropharmacology. 2007. V. 5. P. 19—33.
- Dludla P.V., Jack B., Viraragavan A., Pheiffer C. A dose-dependent effect of dimethyl sulfoxide on lipid content, cell viability and oxidative stress in 3T3-L1 adipocytes // Toxicol. Rep. 2018. V. 5. P. 1014—1020. doi: 10.1016/j.toxrep.2018.10.002. eCollection 2018.
- Elliott G.D., Wang S., Fuller B.J. Cryoprotectants: a review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures // Cryobiology. 2017. V. 76. P. 74—91. doi: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.004.
- Eroglu A., Russo M.J., Bieganski R., Fowler A. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells // Nat. Biotechnol. 2000. V. 18. P. 163—167. doi: 10.1038/72608.
- Eroglu A., Toner M., Toth T.L. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes // Fertility and Sterility. 2002. V. 77. P. 152—158. doi: 10.1016/s0015-0282(01)02959-4.
- Eroglu A. Cryopreservation of mammalian oocytes by using sugars: intra- and extracellular raffinose with small amounts of dimethylsulfoxide yields high cryosurvival, fertilization, and development rates // Cryobiology. 2010. V. 60. P. S54—S59. doi: 10.1016/j.cryobiol.2009.07.001.
- Giwa S., Lewis J.K., Alvarez L., Langer R., Roth A.E. The promise of organ and tissue preservation to transform medicine // Nat. Biotechnol. 2017. V. 35. P. 530—542. doi: 10.1038/nbt.3889.
- Hanslick J.L., Lau K., Noguchi K.K., Olney J.W. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system // Neurobiol. Dis. 2009. V. 34. P. 1—10. doi: 10.1016/j.nbd.2008.11.006.
- Hasanein P., Felegari Z. Chelating effects of carnosine in ameliorating nickel-induced nephrotoxicity in rats // Can. J. Physiol. Pharm. 2017. V. 95. P. 1426—1432.
- Hipkiss A.R., Preston J.E., Himsforth D.T., Worthington V.C. Pluripotent protective effects of carnosine, a naturally occurring dipeptide // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1998. V. 854. P. 37—53. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09890.x.
- Jacob S.W., de la Torre J.C. Pharmacology of dimethyl sulfoxide in cardiac and CNS damage // Pharmacol Rep. 2009. V. 61. P. 225—235. doi: 10.1016/s1734-1140(09)70026-x.
- Khama-Murad A.X., Pavlinova L.I., Mokrushin A.A. Neurotropic effect of exogenous L-carnosine in cultured slices of the olfactory cortex from rat brain // Bull. Exp. Biol. Med. 2008. V. 146. P. 1—3. doi: 10.1007/s10517-008-0227-y
- Khama-Murad A., Mokrushin A., Pavlinova L. Neuroprotective properties of L-carnosine in the brain slices exposed to autolysis in the hemorrhagic stroke model in vitro // Regul. Pept. 2011. V. 167. P. 65—69. doi: 10.1016/j.regpep.2010.11.007.
- Kubomura D., Matahira Y., Masui A. Intestinal absorption and blood clearance of L-histidine-related compounds after ingestion of anserine in humans and comparison to anserine-containing diets // J. Agric. Food Chem. 2009. V. 57. P. 1781—1785. doi: 10.1021/jf8030875.
- Kohen R., Yamamoto Y., Cundy K.C., Ames B.N. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 3175—3179.
- Lenney J.F., George R.P., Weiss A.M., Kucera C.M., Chan P.W., Rinzler G.S. Human serum carnosinase: Characterization, distinction from cellular carnosinase, and activation by cadmium // Clin. Chim. Acta. 1982. V. 123. P. 221—231.
- Lenney J.F., Peppers S.C., Kucera-Orallo C.M., George R.P. Characterization of human tissue carnosinase // Biochem. J. 1985. V. 228. P. 653—660.

- Lopachev A.V., Lopacheva O.M., Akkuratov E.E., Stvolinski S.L., Fedorova T.N.* Carnosine protects a primary cerebellar cell culture from acute NMDA toxicity // *Neurochemical Journal*. 2017. V. 11. P. 38–42. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173457.
- Mandumpal J.B., Kreck C.A., Mancera R.* A molecular mechanism of solvent cryoprotection in aqueous DMSO solutions // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010. V.13. P. 3839–3842. doi: 10.1039/c0cp02326d.
- Matsumura K., Hayashi F., Nagashima T.* Molecular mechanisms of cell cryopreservation with polyampholytes studied by solid-state NMR // *Communications Materials*. 2021. V. 2. P. 116–121.
- Mazur P.* Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing // *J Gen. Physiol.* 1963. V. 47. P. 347–369. doi: 10.1085/jgp.47.2.347.
- Mazur P.* Cryobiology: the freezing of biological systems // *Science*. 1970. V. 168. P. 939–949. doi: 10.1126/science.168.3934.939.
- Mehta A., Prabhakar M., Kumar P.* Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders // *European Journal of Pharmacology*. 2013. V. 698. P. 6–18. doi:10.1016/j.ejphar.2012.10.032.
- Mokrushin A.A., Pavlinova L.I.* Effects of the blood components on the AMPA and NMDA synaptic responses in brain slices in the onset of hemorrhagic stroke // *Gen. Physiol. Biophys.* 2013. V. 32. P. 489–504. doi: 10.4149/gpb\_2013038.
- Mokrushin A.A.* Effects cryopreservation of ionotropic glutamatergic receptor mechanisms in vitro // *CryoLetters*. 2015. V. 36. P. 353–362.
- Namura S., Ooboshi H., Liu J.* Neuroprotection after cerebral ischemia // *Ann. N Y Acad. Sci.* 2013. V. 1278. P. 25–32. doi: 10.1111/nyas.12087.
- Obrenovitch T.P., Urenjak J.* Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy // *Progress Neurobiology*. 1997. V. 51. P. 39. doi: 10.1016/s0301-0082(96)00049-4.
- Pepper E.D., Farrell M.J., Nord G., Finkel S.E.* Antiglycation effects of carnosine and other compounds on the long-term survival of escherichia coli // *Appl. Env. Microbiol.* 2010. V. 76. P. 7925–7930. doi: 10.1128/AEM.01369-10.
- Pichugin Y., Fahy G.M., Morin R.* Cryopreservation of rat hippocampal slices by Vitrification // *Cryobiology*. 2006. V. 52. P. 228–240. doi: 10.1016/j.cryobiol.2005.11.006.
- Qiu J., Hauske S.J., Zhang S.* Identification and characterisation of carnosinate (san9812), a potent and selective carnosinase (cn1) inhibitor with in vivo activity // *Amino Acids*. 2019. V. 51. P. 7–16. doi: 10.1007/s00726-018-2601-z.
- Quyang L., Tian Y., Bao Y., Xu H., Cheng J.* Carnosine decreased neuronal cell death through targeting glutamate system and astrocyte mitochondrial bioenergetics in cultured neuron/astrocyte exposed to ogd/recovery // *Brain Res. Bull.* 2016. V. 124. P. 76–84. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.03.019.
- Sassoe-Pognetto M., Cantino D., Panzanelli P., Verdun-di C.L.* Presynaptic co-localization of carnosine and glutamate in olfactory neurons // *Neuroreport*. 1993. V. 5. P. 7–10. doi: 10.1097/00001756-199310000-00001.
- Stvolinski S.L., Dobrota D., Mezeshova V., Lipta ĩ. T., Pronaiova N., Zalibera L., Boldyrev A.A.* Carnosine and anserine in working muscles-study using proton NMR spectroscopy // *Biokhimiia*. 1992. V. 57. P. 1317–1323.
- Szylowska K., Tymianski M.* Calcium, ischemia and excitotoxicity // *Cell calcium*. 2010. V. 47. P. 122–129. doi: 10.1016/j.ceca.2010.01.003.
- Taylor M.J., Weegman B.P., Baicu S.C., Giwa S.E.* New approaches to cryopreservation of cells, tissues, and organs // *Transfus. Med. Hemotherapy*. 2019. V. 46. P. 197–215. doi: 10.1159/000499453.
- Traynelis S.F., Cull-Candy S.D.* Proton inhibition of *N*-methyl-D-aspartate receptor in cerebellar neurons // *Nature*. 1990. V. 345. P. 347. doi: 10.1038/345347a0.
- Teufel M., Saudek V., Ledig J.P.* Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 6521–6531. doi: 10.1074/jbc.M209764200.
- Vincent P., Mulle C.* Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity // *Neuroscience*. 2009. V. 158. P. 309–323. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.02.066.
- Warren D., Bickler P., Clark J., Gregersen M.* Hypothermia and rewarming injury in hippocampal neurons involves intracellular Ca<sup>2+</sup> and glutamate excitotoxicity // *Neuroscience*. 2012. V. 207. P. 316–325. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.12.034.
- Whaley D., Damyar K., Witek R.P., Mendoza A.* Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations // *Cell Transplant*. 2021. V. 30. P. 963689721999617. doi: 10.1177/0963689721999617.
- Yuan C., Gao J., Guo J., Bai L., Marshall C.* Dimethyl sulfoxide damages mitochondrial integrity and membrane potential in cultured astrocytes // *PLoS ONE*. 2014. V. 9. P. e107447. doi: 10.1371/journal.pone.0107447. eCollection 2014.
- Zhang X., Song L., Cheng X., Yang Y., Luan B., Jia L.* Carnosine pretreatment protects against hypoxia-ischemia brain damage in the neonatal rat model // *Eur. J. Pharm.* 2011. V. 667. P. 202–207. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.06.003.
- Zemke D., Krishnamurthy R., Majid A.* Carnosine is neuroprotective in a mouse model of stroke // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2005. V. 25. P. S313.

**Dipeptide *L*-carnosine ( $\beta$ -alanyl-*L*-histidine) —  
nervous tissue cryoprotector non-hibernate animals**

© 2024 A. A. Mokrushin

*Institute of Physiology, I. P. Pavlov, Academy of Sciences, Saint Petersburg, 199034 Russia  
E-mail: mok@inbox.ru*

In this work, the cryoprotective properties of dipeptide *L*-carnosine ( $\beta$ -alanyl-*L*-histidine) were studied on slices of the olfactory cortex of the brain of rats. Changes in the activity of *N*-methyl-*D*-aspartate receptors were analyzed as the most vulnerable to the effect of cryopreservation (CP), for this purpose, extracellular NMDA potentials were recorded. Slices were incubated with *L*-carnosine (20 mM) in the medium and frozen at a slow rate (0.1 °C/min) down to  $-10$  °C and after CS (30 days) they were heated at the same rate (0.1 °C/min) to  $+37$  °C. The effectiveness of cryoprotection of *L*-carnosine was determined by changes in the amplitudes of NMDA potentials after CP compared to before CP. The dipeptide restored the pH of the freezing medium 6.9 (without *L*-carnosine) to the optimum pH 7.3–7.4, promoted dehydration of free water from slices after CP, inhibited the development of glutamate excitotoxicity in slices. The data obtained prove that *L*-carnosine exhibits the properties of a non-toxic effective cryoprotector in the nervous tissue of warm-blooded non-hibernating animals.

*Key words:* *L*-carnosine, brain slices, NMDA receptors, focal potentials, freezing/warming, cryopreservation.

## ЛЕЙКОЦИТЫ И ТРОМБОЦИТЫ КРОВИ МАЛЫХ СУСЛИКОВ (*SPERMOPHILUS PYGMAEUS* PALL.) ПРИ ЗИМНЕЙ СПЯЧКЕ И ПРОБУЖДЕНИИ

© 2024 г. А. М. Джафарова\*, Ш. И. Чалабов\*\*\*, Н. К. Кличханов\*\*@

\*Дагестанский государственный университет, ул. М. Гаджиева, 43а, г. Махачкала,  
Республика Дагестан, 367000 Россия,

\*\*Институт эволюционной физиологии и биохимии И. М. Сеченова РАН,  
пр. Тореза, 44, г. Санкт-Петербург, 194223 Россия

@E-mail: klich-khan@mail.ru

Поступила в редакцию 04.05.2023

После доработки 31.05.2023

Принята к публикации 01.06.2023

В период гибернации млекопитающие периодически проходят холодную (торпор) и теплую (пробуждение) фазы. Ранее было обнаружено резкое снижение уровней лейкоцитов и тромбоцитов крови в торпидном состоянии, однако динамика их изменений во время пробуждения остается неизвестной. Нами изучены содержание и состав циркулирующих клеток малого суслика во время пробуждения. Количество всех типов лейкоцитов и тромбоцитов в торпидном состоянии существенно снижается. Восстановление уровня лейкоцитов в крови в ходе пробуждения происходит в две фазы: быстрая (Тб 10–20 °С) и медленная (Тб 20–37 °С). В отличие от других типов клеток содержание нейтрофилов после восстановления температуры остается ниже контроля. Во время пробуждения в диапазоне Тб 10–30 °С линейно возрастает уровень тромбоцитов, при этом нормализации параметра Р-LCR не происходит.

**Ключевые слова:** суслики, спячка, пробуждение, лейкоциты, тромбоциты.

**DOI:** 10.31857/S1026347024030073, **EDN:** VAROZB

Зимняя спячка (гибернация) — это форма адаптации, характерная для широкого филогенетического ряда млекопитающих, позволяющая им выжить в условиях дефицита пищи, низкой температуры окружающей среды и сокращения светлого периода суток. Гибернация является энергосберегающей стратегией адаптации за счет значительного снижения температуры тела и метаболизма. Во время глубокой зимней спячки, именуемой торпидным состоянием, у таких небольших млекопитающих, как суслики и хомяки, потребление кислорода падает >90 % и может упасть до ~ 1 %, что приводит к снижению температура тела (Тб) почти до температуры окружающей среды (до 1–5 °С) (Tøien et al., 2001; Geiser, 2004). Гибернирующие суслики с Тб 5 °С, имеют частоту сердечных сокращений 5–10 уд/мин по сравнению с 350–400 в эутермном состоянии (Frerichs et al., 1994), а скорость перфузии органов снижается до <10 % от нормы (McCaig et al., 2001). Скорость дыхания падает от 100–150 вдохов/мин до 1–2 вдохов/мин с длительными периодами апноэ (McArthur, Milsom, 1991). Артериальное давление может упасть с 130/80 до 90/30 мм рт.ст., а сердечный выброс — до 1/60 эутермного уровня (Geiser, 2004).

Торпидное состояние не сохраняется постоянно в течение сезона спячки. Через каждые 1–2 недели животные спонтанно пробуждаются, бодрствуют в течение нескольких часов (12–24 часов), а затем снова входят в спячку (Carey et al., 2003a; Nelson et al., 2010). Пробуждение животных сопровождается быстрым восстановлением многих физиологических функций, в том числе Тб (35–38 °С), потребление кислорода, скорость метаболизма и кровотока (Carey et al., 2003a). Например, во время пробуждения 13-полосных сусликов (*Ictidomys tridecemlineatus*) при повышении Тб с 3 °С до 31 °С (в течение 2 ч) потребление кислорода увеличивалось в 3 раза по сравнению с активным состоянием и в 36 раз по сравнению с торпидным состоянием (Muleme et al., 2006). Эти данные свидетельствуют о том, что в торпидном состоянии животные испытывают длительные ишемически-подобные низкие уровни кровотока и реперфузионно-подобное его восстановление во время пробуждения. Следовательно, каждое межбурное пробуждение можно рассматривать как ишемическую реперфузию, поскольку гипоксические ткани реоксигенируются и нагреваются (Kurtz et al., 2006; Bogren et al., 2014; Otis et al., 2017).

Первичным патомеханизмом ишемии и реперфузионного повреждения является привлечение иммунных клеток, таких как лейкоциты, и образование цитотоксических активных форм кислорода (Thiele et al., 2018). Предполагается, что изменения иммунной системы при гибернации направлены на ограничение повреждений при повторяющихся переходах от спячки к пробуждению (Voima et al., 2010a). Обнаружено, что иммунная система является одним из жизненно важных физиологических компонентов, на которую серьезно влияют экстремальные изменения физиологических состояний во время цикла оцепенение — пробуждение (Voima et al., 2010a; Voima et al., 2011). У всех мелких млекопитающих, изученных к настоящему времени, при гибернации количество лейкоцитов падает, в частности у европейского суслика примерно на 90 %, и быстро возрастает после выхода из нее (Voima et al., 2010b). Кроме того, в период торпора уменьшается содержание белков системы комплемента, снижается фагоцитарная активность, ответ на липополисахариды, а также скорость пролиферации лимфоцитов и продукции цитокинов и антител (Voima et al., 2010a).

Среди множества адаптивных изменений физиологических функций у гибернирующих животных в цикле спячка-пробуждение особого внимания заслуживает не только иммунный статус, но и изменения в системе гемостаза. Торпор является потенциально прокоагулянтным состоянием, поскольку включает в себя множество факторов рисков тромбоза, таких как низкая скорость кровотока (Bullard, Funkhouser, 1962), повышенная вязкость крови (Saunders et al., 2000; Miglis et al., 2002; Hu et al., 2017), неподвижность, хроническая гипоксия и низкая температура тела (Carey et al., 2003), ожирение перед входом в спячку (Martin, 2008). Известно, что низкая температура приводит к активации и агрегации тромбоцитов у млекопитающих (Straub et al., 2011). Помимо агрегации, активация тромбоцитов также приводит к воспалительным реакциям и потенциальному повреждению органов, например через образование комплекса тромбоцитов с лейкоцитами (Ghasemzadeh, Hosseini, 2013). Агрегация тромбоцитов обычно приводит к образованию тромба, однако у гибернирующих животных в период оцепенения каких-либо повреждений органов в результате тромботических осложнений не наблюдается. Оказалось, что гибернация связана с существенными изменениями в системе гемостаза во время оцепенения, способствующими снижению риска тромбоза, в том числе за счет снижения количества тромбоцитов более чем на 90 % и уменьшения содержания факторов свертывания крови (Cooper et al., 2012; de Vrij et al., 2014). При этом у гибернирующих сусликов (Lechler, Penick, 1963; Pivogun, Sinnamon, 1981) и хомяков (de Vrij et al., 2014) количество тромбоцитов в течение 2 часов после пробуждения быстро восстанавливается, что предотвращает риски кровотечения.

Несмотря на то, что изменение содержания лейкоцитов и тромбоцитов в торпидном состоянии и после пробуждения изучено достаточно подробно, данные об изменении их содержания в крови в процессе пробуждения почти отсутствуют. Для более детального анализа и глубокого понимания механизмов существенных периодических изменений содержания клеточных факторов крови, отвечающих за реализацию ее важнейших функций (защитной и гемостатической), мы исследовали в крови у малых сусликов (*Spermophilus pygmaeus*) в торпидном состоянии и в ходе пробуждения, когда непрерывно изменяется температура тела и скорость кровотока, (1) количество и популяционный состав лейкоцитов и (2) количество тромбоцитов и их параметры. Поскольку случайное и терапевтическое переохлаждение у людей также связано с тромбоцитопенией (Jacobs et al., 2013; Mallet, 2002; Wang et al., 2015), знание закономерностей, лежащих в основе этого механизма, может помочь в гемостатическом лечении гипотермии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объекты исследования.** Исследования были выполнены на малых сусликах *Spermophilus pygmaeus* Pall. с массой тела животных 250—300 г, отловленных в Буйнакском районе Республики Дагестан (Северо-восточный склон горы Кукуртбаш, 200 м южнее кутана «Чечлибин» — 42°55'S, 47°20'W; 320 м). Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. При выполнении настоящего исследования были соблюдены все нормы и правила проведения экспериментальных работ с использованием лабораторных животных (Директива 2010/63/EU Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях).

**Моделирование зимней спячки и пробуждения.** Животные были случайным образом распределены на 7 групп (по 6 особей в каждой). Первую группу составляли бодрствующие в летний период животные (контроль), вторую — животные, находящиеся в состоянии глубокой зимней спячки, третью — седьмую — животные, находящиеся на различных этапах индуцированного пробуждения. В летний период животных содержали в условиях вивария в индивидуальных клетках (60×40×40 см), каждая из которых была оборудована одним гнездом, подстилкой и гнездовым материалом. Эти клетки устанавливали в помещении при естественном фотопериоде, при постоянной температуре 25 °С и свободном доступе к пище и воде. Животные получали гранулированный корм для грызунов («Лабораторкорм», Россия), в который дополнительно включали неочищенные семечки, свежую капусту, морковь и зелень. Для индукции зимней спячки в конце октября сусликов пересаживали в индивидуальные стандартные лабораторные клетки (36×20×14 см), каждая из которых

была снабжена индивидуальным гнездом для полноценной спячки, и содержали при температуре 4 °C в постоянной темноте, без еды и воды. Через несколько дней животные впадали в спячку с понижением температуры тела (Тb) до  $3.8 \pm 0.4$  °C. После двух месяцев гибернации средняя длительность баута составляла  $14 \pm 0.5$  сут. Для экспериментов по индуцированному пробуждению животных брали в торпидном состоянии в середине баута (7 сут от начала повторного впадения в спячку). Для запуска процесса пробуждения животных переносили в помещение с температурой 20 °C. Полное пробуждение животных и подъем температуры тела до 37 °C происходили примерно за  $2.4 \pm 0.2$  ч. По достижении Тb 10 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C у животных производили забор биоматериала. Температуру тела (ректальную) измеряли перед забоем животного с помощью термометра MS6501 (Mastech, Гонконг).

**Исследование клеток крови.** Нормотермических и пробуждающихся животных с Тb выше 20 °C анестезировали внутривенной инъекцией пентобарбитала натрия (50 мг/кг). Образцы крови брали из яремной вены с помощью шприца, содержащего антикоагулянт (К3-ЭДТА, 1.5 мг/мл). Анализ содержания клеток крови проводили на автоматическом гематологическом анализаторе Sismex KX-21N (Sysmex Corporation, Japan) со стандартной калибровкой в соответствии с инструкциями производителя. Предыдущие исследования показали успешный анализ крови мелких млекопитающих с использованием системы Sysmex (Lilliehöök, Tvedten, 2009; Hu et al., 2017). Измерены следующие параметры лейкоцитов: общее количество лейкоцитов в 1 л крови (WBC), абсолютное число лимфоцитов в 1 л крови (LYM), абсолютное суммарное содержание базофилов, эозинофилов и моноцитов в 1 л крови (MXD), абсолютное число нейтрофилов в 1 л крови (NEUT). Кроме общего количества тромбоцитов ( $PLT \times 10^3$ /мкл) для этих клеток определяли значения следующих параметров: тромбокрит (PCT, %), средний объем тромбоцита (MPV, fL), относительный диапазон распределения по объему (PDW, fL), доля клеток с объемом, превышающим 12 фл (P-LCR, %). Исследование тромбоцитарных параметров осуществлялось не позднее 2 ч от момента взятия крови для исключения влияния коагулянта на состояние тромбоцитов.

Проверка автоматизированного подсчета клеток и дополнительная морфологическая идентификация подтипов лейкоцитов были произведены в мазках крови, окрашенные по Романовскому—Гимзе.

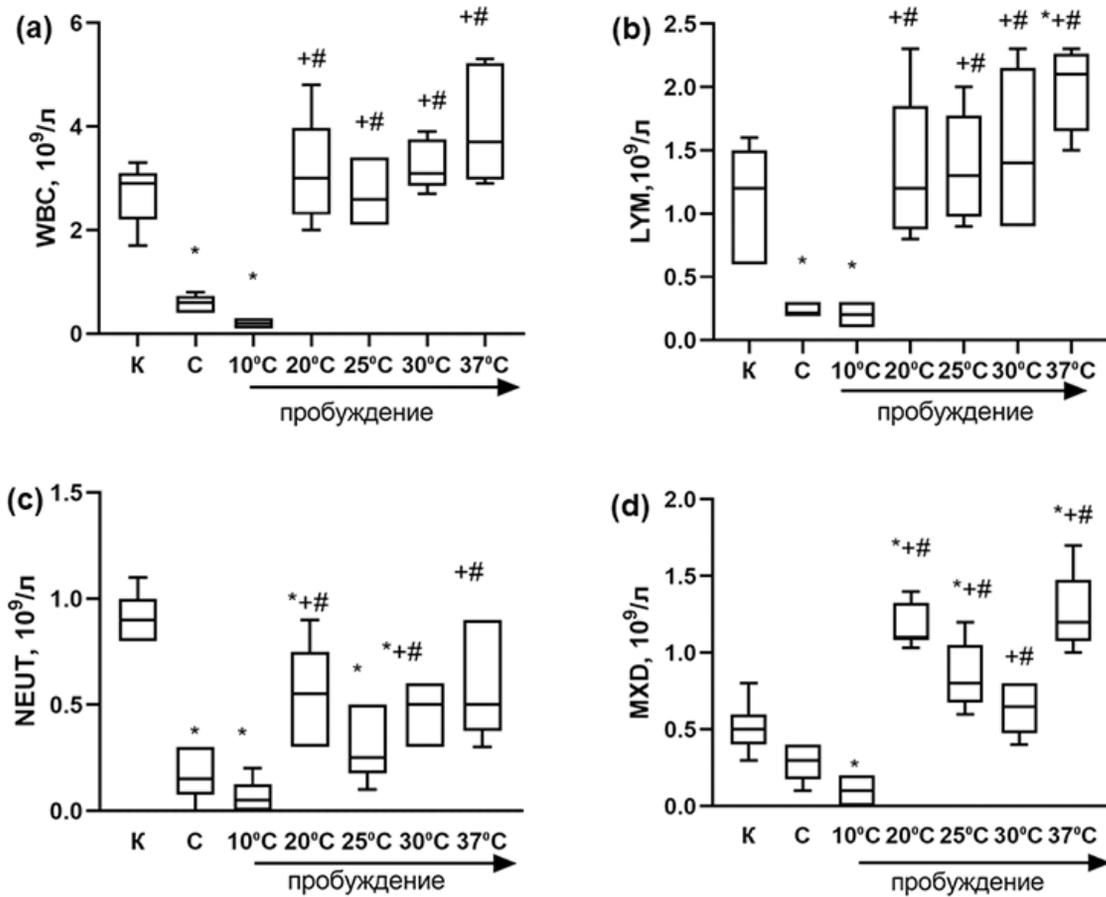
**Статистическая обработка.** Обработка данных произведена с использованием пакетов прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., США) и SPSS Statistics 22 (IBM, США). Нормальность распределения определяли критерием Шапиро—Уилка. Равенство дисперсий экспериментальных данных оценивали с помощью критериев Левеня и Уэлча. Для множественных сравнений независимых групп использовали непараметрический дисперсионный анализ и критерий Краскела—Уоллиса (H-test). При обнаружении

статистически значимых различий между группами проводили апостериорные сравнения с помощью критерия Манна—Уитни с новым критическим уровнем значимости, учитывающим количество сравниваемых групп. Данные на рисунках представлены в виде блочных диаграмм с указанием медианы, нижнего и верхнего квартилей — Me [Q1: Q3], а также минимального и максимального значений выборки. Для оценки зависимости некоторых параметров от температуры тела животного использовали регрессионный анализ, а для определения силы и характера взаимосвязи — корреляционный анализ Спирмена.

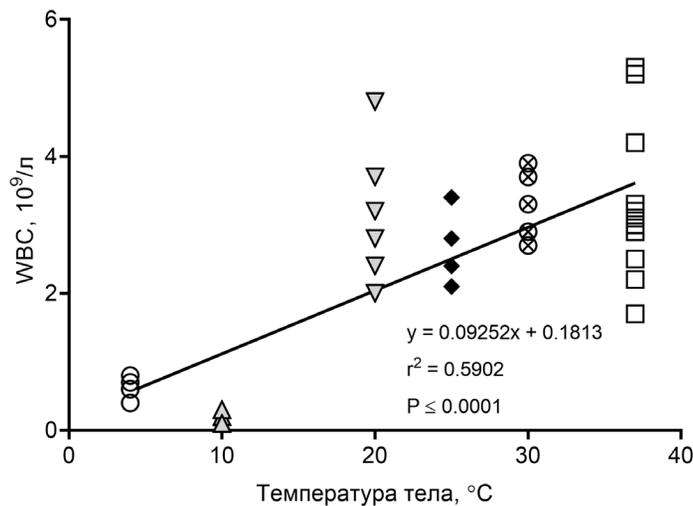
## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Лейкоциты крови в цикле спячка—пробуждение.** У контрольных животных количество WBC в крови составляет  $2.9 [2.2:3.1] \times 10^9$ /л. У спящих сусликов происходит резкое падение уровня WBC (рис. 1a). В торпидном состоянии в крови сусликов остается менее 20.7 % WBC от их уровня у контрольных животных (рис. 1a), что примерно в 2 раза выше, чем у других видов сусликов в торпидном состоянии (Bouta et al., 2010a). Перенос спящих животных в помещение с температурой 20 °C на начальных этапах за счет пассивного согревания приводит к повышению температуры тела сусликов. У пробуждающихся сусликов с Тb 10 °C происходит дальнейшее снижение количества WBC в крови относительно торпидного состояния ( $0.6 [0.4:0.72] \times 10^9$ /л в торпидном состоянии,  $0.2 [0.1:0.3] \times 10^9$ /л при Тb 10 °C). Согревание животных до Тb 20 °C резко увеличивает уровень WBC в крови. Их количество достигает уровня контроля и становится в 15 раз выше уровня лейкоцитов у животных с Тb 10 °C ( $p < 0.05$ ). При Тb 25 °C рост количества WBC прекращается, но при последующем согревании количество WBC снова начинает расти, достигая после полного пробуждения значений, на 27.9 % превышающих уровни контрольных животных. Результаты регрессионного свидетельствуют о существенном влиянии температуры тела сусликов на WBC ( $r^2 = 0.59$ ,  $p < 0.0001$ ) (рис. 2).

У контрольных животных количество лимфоцитов (LYM) составляет  $1.2 [0.6:1.5] \times 10^9$ /л. В торпидном состоянии количество LYM в крови снижается на 83.4 % относительно контроля (рис. 1b). Согревание до Тb 10 °C не влияет на уровень LYM в крови относительно торпидного состояния. Однако при достижении Тb 20 °C наблюдается резкое повышение уровня LYM относительно торпидного состояния. Причем содержание лимфоцитов возрастает до контрольного уровня. При Тb 25 °C число LYM остается на уровне предыдущего этапа согревания, однако в диапазоне Тb 30—37 °C снова наблюдается быстрый рост количества LYM, достигающий при полном разогреве животных уровня, на 75 % ( $p < 0.05$ ) превышающего контрольные значения. Между LYM и температурой тела сусликов обнаружена положительная корреляция ( $r = 0.71$ ,  $p < 0.05$ ).



**Рис. 1.** Динамика изменения WBC (a), LYM (b), NEUT (c) и MXD (d) в крови сусликов при зимней спячке и индуцированном пробуждении (Me [Q1: Q3]), минимальное и максимальное значение выборки;  $p < 0.05$  относительно: \* — контроля, + — спячки, # — начальных этапов пробуждения Тб10 °С). К — контроль, С — торпидное состояние. Стрелкой указана температура тела во время пробуждения.



**Рис. 2.** Регрессионный анализ влияния температуры тела сусликов на WBC крови.

У контрольных животных количество нейтрофилов (NEUT) составляет  $0.9 [0.8:1.0] \times 10^9/\text{л}$  (рис. 1с). В торпидном состоянии количество NEUT в крови уменьшается до менее 16.6% от их уровня у контрольных животных. Во время согревания при  $T_b 10^\circ\text{C}$  содержание NEUT в крови продолжает снижаться, достигая у некоторых животных нулевого уровня. Согревание до  $T_b 20^\circ\text{C}$  увеличивает число NEUT в крови в 3.7 раз относительно торпидного состояния, но их уровень остается значительно ниже значений контроля ( $0.55 [0.30:0.75] \times 10^9/\text{л}$  при  $T_b 20^\circ\text{C}$ ,  $0.9 [0.8:1.0] \times 10^9/\text{л}$  контроль). Дальнейший рост температуры тела сначала ( $T_b 25^\circ\text{C}$ ) способствует уменьшению количества NEUT, а затем ( $T_b 35\text{—}37^\circ\text{C}$ ) — увеличению их количества. Однако после полного согревания животных количество NEUT не восстанавливается до контрольного уровня, оставаясь на 44.4% ( $p < 0.05$ ) ниже его. Между NEUT и температурой тела сусликов обнаружена положительная корреляция ( $r = 0.73$ ,  $p < 0.05$ ).

Расчет отношения нейтрофилов к лимфоцитам (NEUT/LYM) показал, что у контрольных сусликов оно равно  $0.83 [0.66:0.92]$ . Спячка мало влияет на это соотношение, незначительно снижая его до  $0.75 [0.50:0.84]$ . Начальный этап согревания ( $T_b 10^\circ\text{C}$ ) способствует снижению NEUT/LYM относительно контрольных животных на 69.8% (NEUT/LYM =  $0.25 [0.18:0.33]$ ,  $p < 0.05$ ). Согревание до  $T_b 20^\circ\text{C}$  значительно (на 80%,  $p < 0.05$ ) увеличивает этот показатель относительно сусликов с  $T_b 10^\circ\text{C}$  — он становится равным  $0.45 [0.39:0.56]$ . Однако дальнейший разогрев животного снова снижает отношение NEUT/LYM так, что даже после полной нормализации температуры тела оно остается на очень низком по сравнению с контролем и спячкой уровне (при  $T_b 25^\circ\text{C}$  —  $0.19 [0.14:0.25]$ ,  $T_b 30^\circ\text{C}$  —  $0.35 [0.29:0.42]$ ,  $T_b 37^\circ\text{C}$  —  $0.23 [0.17:0.28]$ ).

У контрольных животных параметр MXD, отражающий абсолютное суммарное количество моноцитов, эозинофилов и базофилов в крови, составляет  $0.5 [0.45:0.6] \times 10^9/\text{л}$  (рис. 1d). Спячка способствует существенному (на 40%,  $p < 0.05$ ) снижению MXD в крови. Учитывая то, что содержание эозинофилов и базофилов в крови грызунов очень низкое (Barker, Vooustra, 2005; Vouma et al., 2010b), основной вклад в изменение значения параметра MXD вносят моноциты. Согревание животных до  $T_b 10^\circ\text{C}$  индуцирует дальнейшее падение уровня MXD (на 80%). При  $T_b 20^\circ\text{C}$  происходит его значительный рост не только относительно спячки (в 3.6 раза), но и относительно контроля (в 2.2 раза). Дальнейшее согревание снижает уровень MXD по сравнению с  $T_b 20^\circ\text{C}$ . Однако при  $T_b 37^\circ\text{C}$  снова наблюдается значительный прирост клеток средних размеров и их количество становятся равным таковому у сусликов с температурой тела  $20^\circ\text{C}$ . Между MXD и температурой тела сусликов обнаружена положительная корреляция ( $r = 0.53$ ,  $p < 0.05$ ).

**Тромбоциты крови в цикле спячка—пробуждение.** У активных в летний период животных количество тромбоцитов (PLT) в крови составляет  $110 [98:130] \times 10^9/\text{л}$  (рис. 3а). Переход в торпидное

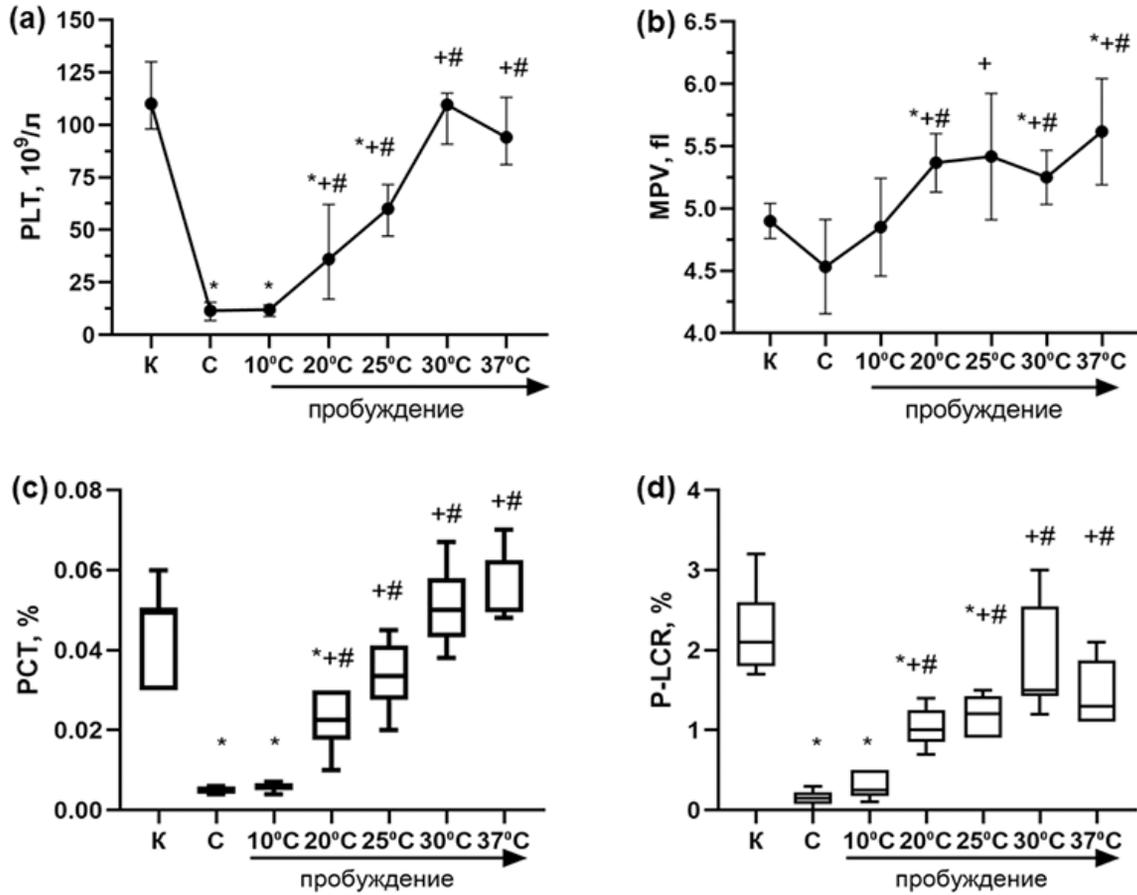
состояние резко снижает количество PLT в крови. У спящих сусликов в крови остаются около 10% тромбоцитов от их уровня у контрольных животных ( $11.5 [6.7:15.5] \times 10^9/\text{л}$ ), что согласуется с данными других исследователей. Запуск процесса пробуждения с повышением  $T_b$  до  $10^\circ\text{C}$  не изменяет количество PLT относительно торпидного состояния. В диапазоне  $T_b 20\text{—}30^\circ\text{C}$  обнаружен почти линейный рост PLT, достигающего уровня контроля, и после нормализации  $T_b$  их количество существенно не изменяется. Результаты регрессионного анализа свидетельствуют о существенном влиянии температуры тела сусликов на PLT ( $r^2 = 0.82$ ,  $p < 0.0001$ ) (рис. 4).

У летних контрольных животных средний объем тромбоцитов (MPV) составляет  $4.9 [4.8:4.9]$  fl (рис. 3б). В торпидном состоянии этот параметр незначительно снижается — до  $4.6 [4.15:4.85]$ , но в начале пробуждения ( $T_b 10^\circ\text{C}$ ) сусликов начинается рост объема тромбоцитов, в результате которого при  $T_b 20^\circ\text{C}$  уровень MPV достигает значений, превышающих контрольные уровни на 10.2% ( $5.4 [5.1:5.5]$ ), и остается таким вплоть до полного пробуждения сусликов. Интересно то, что между MPV и температурой тела сусликов практически отсутствуют корреляционные связи ( $r = 0.046$ ).

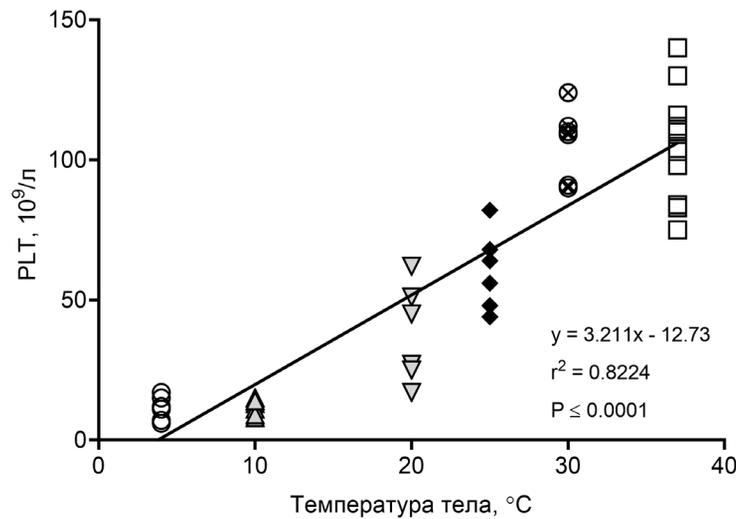
У летних контрольных животных тромбоцит (PCT) составляет  $0.05 [0.03:0.05]\%$  (рис. 3с). В торпидном состоянии уровень PCT снижается в 9.7 раз и остается приблизительно таким же низким на начальных этапах согревания ( $T_b 10^\circ\text{C}$ ), демонстрируя тенденцию к незначительному росту. В ходе дальнейшего согревания PCT резко увеличивается при  $T_b 20^\circ\text{C}$  (в 3.7 раза по сравнению с PCT при  $T_b 10^\circ\text{C}$ ) и продолжает постепенно расти, достигая при  $T_b 30^\circ\text{C}$  уровня контроля, а затем не изменяется. Между PCT и температурой тела сусликов обнаружена высокая степень положительной корреляции ( $r = 0.90$ ,  $p < 0.05$ ).

У контрольных сусликов количество больших (больше 12 fL) тромбоцитов (P-LCR) составляет  $2.1 [1.8:2.6]\%$  (рис. 3д). При спячке содержание таких клеток достигает очень низких уровней  $0.15 [0.75:0.22]\%$  и незначительно начинает повышаться на начальных этапах согревания (до  $0.25 [0.18:0.5]\%$ ). При достижении  $T_b 20^\circ\text{C}$  происходит резкое относительно спячки повышение (в 6.7 раза,  $p < 0.05$ ) P-LCR. В диапазоне  $T_b 20^\circ\text{C}\text{—}30^\circ\text{C}$  содержание гигантских тромбоцитов постепенно увеличивается, достигая при  $T_b 30^\circ\text{C}$  максимального значения ( $1.5 [1.5:2.4]\%$ ), которое на 28.6% ниже контрольных значений. У полностью разогретых животных уровни гигантских тромбоцитов снижаются до уровней животных с  $T_b 25^\circ\text{C}$ . Между P-LCR и температурой тела сусликов обнаружена высокая степень положительной корреляции ( $r = 0.83$ ,  $p < 0.05$ ).

Анализ параметра PDW, демонстрирующего распределение тромбоцитов по объему, показал, что при спячке данный показатель снижается (контроль —  $9.1 [8.9:9.2]\%$ , спячка —  $8.35 [8.2:8.4]$  fl,  $p < 0.05$ ) (рис. 5).

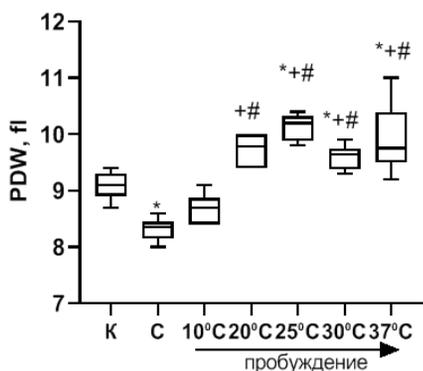


**Рис. 3.** Динамика изменения PLT (a), MPV (b), PCT (c) и P-LCR (d) в крови сусликов при зимней спячке и индуцированном пробуждении (на диаграммах — Ме [Q1: Q3], минимальное и максимальное значения выборки; на графиках — Ме [Q1: Q3];  $p < 0.05$  относительно \* — контроля, + — спячки, # — начальных этапов пробуждения Tb10 °C). К — контроль, С — торпидное состояние. Стрелкой указана температура тела во время пробуждения.

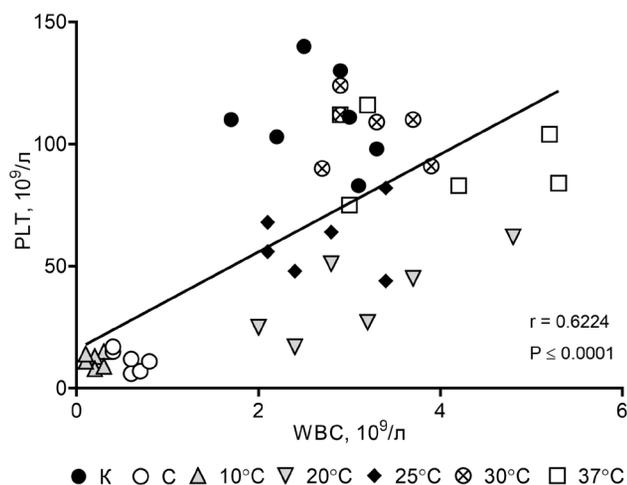


**Рис. 4.** Регрессионный анализ влияния температуры тела сусликов на PLT крови.

На начальных этапах пробуждения (Тб 10 °С) имеет тенденция к незначительному повышению PDW. Однако у животных с Тб 20 °С данный показатель становится существенно (на 17.1 %,  $p < 0.05$ ) выше PDW спящих животных и достигает при Тб 25 °С максимальных значений (10.2[9.9:10.3]). Это указывает на то, что диапазон распределения тромбоцитов по объему на данном этапе согревания становится несколько шире (рис. 5). Дальнейшее согревание животных незначительно снижает PDW до уровней, близких к контрольным значениям. Между PDW и температурой тела сусликов имеется достаточно слабая корреляция ( $r = 0.58$ ,  $p < 0.05$ ).



**Рис. 5.** Динамика изменения PDW в крови сусликов при зимней спячке и индуцированном пробуждении (Me [Q1: Q3]), минимальное и максимальное значения выборки;  $p < 0.05$  относительно \* — контроля, + — спячки, # — начальных этапов пробуждения Тб10 °С. К — контроль, С — торпидное состояние. Стрелкой указана температура тела во время пробуждения.



**Рис. 6.** Корреляция между WBC и PLT в крови сусликов при зимней спячке и индуцированном пробуждении. К — контроль, С — торпидное состояние.

Результаты корреляционного анализа указывают на то, что между количеством лейкоцитов и тромбоцитов имеется достаточно выраженная связь ( $r = 0.62$ ,  $p < 0.0001$ ) (рис. 6).

## ОБСУЖДЕНИЕ

**Лейкоциты при спячке и пробуждении.** Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют о значительном снижении числа циркулирующих лейкоцитов в торпидном состоянии у малых сусликов (рис. 1а). В общей циркуляции в торпидном состоянии остается только 20.7 % от общего числа лейкоцитов. Выраженная лейкопения, обнаруженная нами, согласуется с данными, полученными у других видов сусликов (Pivorun, Sinnamon, 1981; Szilagyi, Senturia, 1972; Spurrier, Dawe, 1973; Frerichs et al., 1994; Toien et al., 2001; Bouma et al., 2010b, 2011), хомяков (Reznik et al., 1975), летучих мышей (Kizhina et al., 2018; Uzenbaeva et al., 2019), мелких сумчатых (Franco et al., 2013), а также медведей (Sahdo et al., 2013) в гибернарующем состоянии. При этом исследование сезонной динамики гематологических параметров крови у различных представителей сем. Cricetinae, демонстрирующих торпор (джунгарские хомячки) или различные варианты спячки (хомячки эверсманна, обыкновенный хомяк), не выявило достоверных изменений числа лейкоцитов в зимний период (Кузнецова, 2019). По мнению автора, отсутствие изменений числа циркулирующих лейкоцитов у этих видов связано с более редкими эпизодами гипотермии и меньшей их глубиной по сравнению с истинными гибернаторами. Однако у монгольского хомяка, демонстрирующего нестандартную короткую спячку с частыми баутами сна в зимний период, наблюдалась существенная лейкопения с достоверным снижением всех форм лейкоцитов, что сближает его с истинными гибернаторами (Кузнецова, 2019).

Следовательно, снижение количества лейкоцитов в крови является общим механизмом адаптации млекопитающих во время спячки. Поскольку у мелких гибернаторов количество циркулирующих лейкоцитов резко падает, когда температура тела снижается до 5 °С, было высказано мнение, что иммунная депрессия, вызванная гибернацией, является температурно зависимым механизмом (Bouma et al., 2011). Межвидовое сравнение показывает, что для разных таксонов угнетение иммунной функции действительно проявляется как прямая функция температуры, достигаемой во время оцепенения (Sahdo et al., 2013). Мы также обнаружили достаточно высокую степень положительной корреляции между температурой тела и содержанием лейкоцитов.

Падение общего количества лейкоцитов, обнаруженное нами в торпидном состоянии, обусловлено снижением количества всех типов лейкоцитов (рис. 1b, c, d). Поскольку количество циркулирующих

лейкоцитов резко уменьшается в торпидном состоянии и увеличивается в ходе пробуждения, предполагают, что секвестрация клеток в органах является наиболее важным объяснением уменьшения их количества в крови во время гибернации. Имеющиеся данные указывают на то, что лейкоциты могут накапливаться в кишечнике, костном мозге, селезенке и печени во время гибернации (Yasuma et al., 1997; Kurtz, Carey, 2007; Vouma et al., 2010a, Vouma et al., 2010b). При этом зрелые нейтрофилы преимущественно сохраняются в селезенке, печени, легких, лимфоидных органах или сосудах, а лимфоциты — в лимфоидных органах (Vouma et al., 2010a, 2010b; Havenstein et al., 2016). Увеличение количества нейтрофилов на эпителиальном барьере легких (Inkovaara, Suomalainen, 1973) и увеличение лимфоцитов преимущественно на эпителиальном барьере кишечника (Kurtz, Carey, 2007) связывают с защитными реакциями в местах воздействия потенциальных патогенов в период целенаправленной иммуносупрессии во время торпора. Установлено, что вызванная гипотермией задержка лимфоцитов в периферических лимфоидных органах связана с резким падением уровня сфингозин-1-фосфата (Vouma et al. 2011).

Нейтрофилопения во время торпора обусловлена вызванной гипотермией обратимой маргинацией и адгезией клеток к стенке сосудов, поскольку на нее не влияла спленэктомия и она устранялась предварительным введением дексаметазона, оказывающего ингибирующее влияние на маргинацию (Vouma et al., 2013a). Кроме того, Купер с коллегами (Cooper et al., 2016) в костном мозге тринадцатиполосых сусликов в торпидном состоянии обнаружили существенное увеличение экспрессии белков, участвующих в адгезии и секвестрации лейкоцитов. Об усилении экспрессии молекул адгезии на эндотелиальных клетках сосудов тринадцатиполосых сусликов (*Spermophilus tridecemlineatus*) в торпидном состоянии свидетельствуют также данные Ясумы и коллег (Yasuma et al., 1997).

Снижение количества всех типов лейкоцитов в торпидном состоянии может быть связано с существенным подавлением продукции клеток в костном мозге при низких температурах тела. Было показано, что костный мозг гибернирующих сусликов в целом содержит меньше клеток, чем костный мозг неспящих животных (Szilagyi, Senturia, 1972). Снижение активности костного мозга в торпидном состоянии, как полагают, может быть связано и с такими факторами, как длительный период неподвижности, гипометаболизм и окислительный стресс в период гибернации, каждый из которых способен снижать активность костного мозга (Cooper et al., 2016).

Количество лейкоцитов в крови может определяться не только скоростью их производства в костном мозге, но и скоростью их высвобождения и поступления в кровоток. Поступление нейтрофилов из костного мозга в кровь регулирует рецептор CXCR4, активацию которого осуществляет хемокин CXCL12 стромальных клеток костного мозга

(Eash et al., 2009). Важную роль в высвобождении нейтрофилов из костного мозга играет также рецептор хемокинов CXCR2 (Eash et al., 2010). У тринадцатиполосых сусликов в торпидном состоянии обнаружено четырехкратное снижение уровня мРНК CXCR2 и 3,5-кратное снижение экспрессии CXCR4 в костном мозге (Cooper et al., 2016), что может быть причиной наблюдаемого снижения количества нейтрофилов в крови во время гибернации.

Лейкоцитопения может быть обусловлена также деградацией клеток крови в период спячки. Известно, что моноциты и гранулоциты имеют относительно короткую продолжительность жизни: например, у мышей полупериод жизни циркулирующих моноцитов оценивается в 22 часа (Furth, Cohn, 1968), нейтрофилов — 11.4 ч, а других гранулоцитов — 10.7 ч (Basu et al., 2002). При этом продолжительность баута оцепенения намного больше, чем время нахождения нейтрофилов в циркуляции. Так, по нашим данным продолжительность баута в середине января у малых сусликов составила примерно 14—15 суток (336—360 ч). С другой стороны, при низких температурах тела период полураспада гранулоцитов тоже может существенно удлиниться.

Лимфоциты не могут производиться так быстро, как гранулоциты. Исследования скорости оборота клеток на мышах показали, что период полураспада В-клеток составляет от нескольких недель до месяцев (Sprent, 1973, 1993). У мышей с нормальной вилочковой железой скорость пролиферации наивных Т-клеток составляет 0,2 % в день, а клеток памяти — 1 % в день (Parretta et al., 2008). Оказалось, что у гибернирующих животных наблюдается сезонная инволюция тимуса (Колаева и др., 2003; Galletti, Cavallari, 1972). Из ткани тимуса почти исчезают лимфоциты, а железистый эпителий замещается бурой жировой тканью. Следует отметить, что уже в период подготовки сусликов к спячке (октябрь) количество лимфоидных клеток в тимусе значительно снижалось, а также резко снижалась скорость как спонтанной, так и митогенстимулирующей пролиферации лимфоцитов (Новоселова и др., 2004). Как полагают, определенную роль в лимфопении в торпидном состоянии может играть аденозин-5-монофосфат (5-АМР), выделяемый зимой бурой жировой тканью, оказывающий антилимфопротеративные эффекты (Atanassov et al., 1995).

Лимфопения в период спячки может быть вызвана не только резким снижением скорости их образования в костном мозге, но также их усиленной деградацией. Чтобы выяснить, подвергаются ли лимфоциты массовому апоптозу в торпидном состоянии, был измерен размер белой пульпы в селезенке у спящих и пробуждающихся европейских сусликов (*Spermophilus citellus*). Оказалось, что гибернация существенно не влияет на размер белой пульпы в селезенке (Vouma et al., 2010b). Таким образом, лимфопения во время оцепенения не может быть вызвана массовым апоптозом лимфоцитов в селезенке.

Интересно то, что вклад в снижение общего числа лейкоцитов в торпидном состоянии у малых сусликов вносят в равной степени как нейтрофилы, так и лимфоциты, что способствует сохранению отношения гранулоцитов к лимфоцитам на уровне активных летом животных. При этом количество других клеток тоже уменьшается, но не столь драматически. Значительное снижение количества лейкоцитов в торпидном состоянии свидетельствует об истощении клеточных факторов как специфического, так и неспецифического иммунитета. В нескольких исследованиях сообщалось об общем нарушении функции врожденного, а также клеточного и гуморального адаптивного иммунитета во время спячки, в том числе пониженные уровни комплемента (Maniero, 2002), снижение фагоцитарной способности макрофагов (Huber et al., 2021), уменьшение пролиферации лимфоцитов (Atanassov et al., 1995), отсутствие врожденного иммунного ответа на введение липополисахарида (Prendergast et al., 2002), а также снижение продукции цитокинов и антител (Burton, Reichman, 1999; Sidky et al., 1972; Jaroslow, Serrell, 1972; Bouma et al. 2013b). Такая ситуация, наряду с ранее обнаруженным у спящих сусликов снижением продукции цитокинов макрофагами (фактора некроза опухоли- $\alpha$ ) и лимфоцитами (интерферона  $\gamma$ ) (Novoselova et al., 2000; Kandefér-Szerszen, 1988), может серьезно снизить эффективный иммунный ответ на различные патогены.

Известно, что у млекопитающих нейтрофилы являются частью первой линии врожденной клеточной иммунной защиты от вторжения патогенов (Mantovani et al., 2011; Dahlgren et al., 2019). Активированные нейтрофилы генерируют и высвобождают супероксидные радикалы, из которых образуются другие активные формы кислорода (АФК), способные не только уничтожать патогены, но повреждать собственные ткани (Thiele et al., 2018; Dinauer, 2020). Индуцированная выработка АФК сопровождается резким увеличением потребления клетками кислорода, также называемым «окислительным взрывом». Недавно Хубер с коллегами (Huber et al., 2021), используя хемилуминесцентный анализ в режиме реального времени, показали, что в торпидном состоянии у садовой сони (*Eliomys quercinus*) способность нейтрофилов к окислительному взрыву значительно снижена. Райтсема и коллеги (Reitsema et al., 2021) также обнаружили, что у хомяков через 1.5 ч после начала пробуждения в нейтрофилах происходит сильное подавление активности фагоцитоза и интенсивности окислительного взрыва. Эти авторы считают, что подавление функции нейтрофилов с точки зрения их способности продуцировать радикалы кислорода может свести к минимуму воспаление и, возможно, повреждение органов как в торпидном состоянии, так и во время пробуждения.

Согласно данным литературы, у различных видов гибернаторов в периферической крови, как правило, преобладают нейтрофилы (примерно 90%),

а количество лимфоцитов существенно меньше — около 9% (Szilagyí, Senturia, 1972). В нашем исследовании у малого суслика лимфоциты и моноциты являются преобладающими типами лейкоцитов, как у контрольных животных, так и у животных в период гибернации (рис. 1). У садовой сони лимфоциты тоже являются преобладающим типом лейкоцитов как во время раннего (71%), так и позднего торпора (52%) (Huber et al., 2021). В период гибернации у летучей мыши северного кожанка (*Eptesicus nilssonii*), в отличие от ночницы Брандта (*Myotis brandti*) и бурого ушана (*Plecotus auritus*), в периферической крови также преобладали лимфоциты (Узенбаева и др., 2015). Существенные различия в популяционном составе лейкоцитов различных гибернирующих животных при спячке и пробуждении, скорее всего, обусловлены их видовой специфичностью.

Предполагают, что высокая доля лимфоцитов в торпидном состоянии у садовых сонь может иметь иммунопротекторную роль (Huber et al., 2021). Так, у тринадцатиполосых сусликов способность к гуморальному иммунному ответу на Т-лимфоцит-зависимый антиген (NP-овальбумин) оставалась оптимальной во время гибернации (Bouma et al., 2013b). Более того, иммунизация гибернирующих сусликов NP-овальбумином вызвала выработку антител и нарушение режима гибернации, т. е. атипичное (экстренное) согревание и выход из оцепенения, сопряженный с повышенной смертностью животных (Bouma et al., 2013b).

Перенос гибернирующих сусликов с  $T_b 3.8 \pm 0.4^\circ\text{C}$  из индивидуальных клеток в помещение с температурой  $25^\circ\text{C}$  способствовал их пробуждению. Подъем  $T_b$  до  $37^\circ\text{C}$  и полное их пробуждение происходили в течение  $2.2 \pm 0.2$  ч. Пробуждение сусликов сопровождалось повышением количества лейкоцитов в крови, как это обнаружено у других видов сусликов (Bouma et al., 2013b). В начале пробуждения, когда температура тела за счет пассивного согревания возросла до  $10^\circ\text{C}$  (~ 24 мин), количество лейкоцитов и их субпопуляции не только не увеличиваются, но имеют тенденцию к снижению. Таким образом, лейкоцитопения при  $T_b 10^\circ\text{C}$  становится еще более выраженной.

Во время пробуждения сусликов изменения в количестве лейкоцитов в крови происходят в виде двух фаз: быстрая ( $T_b 10\text{—}20^\circ\text{C}$ ) и медленная ( $T_b 20\text{—}37^\circ\text{C}$ ). В быстрой фазе происходит резкий рост количества всех типов лейкоцитов в крови. В начале медленной фазы рост количества лейкоцитов прекращается, и только при последующем согревании вплоть до окончательного пробуждения их количество медленно увеличивается. Основной вклад в увеличение количества лейкоцитов при  $T_b 20^\circ\text{C}$  во время пробуждения вносят моноциты и лимфоциты. Интересно то, что уровни LYM и MXD у полностью согретых сусликов становятся существенно выше таковых у летних эутермных животных (LYM на 75%, MXD в 2.4 раза) (рис. 1b, d). При этом восстановление

содержания нейтрофилов происходит не столь эффективно. Их количество в крови составляет лишь 55.5% от летнего контрольного уровня. В тоже время у тринадцатиполосых сусликов, напротив, при восстановлении температуры тела до нормотермного уровня быстро восстанавливалось содержание нейтрофилов и моноцитов в крови, а содержание лимфоцитов запаздывало и составляло лишь половину наблюдаемого у активных летом животных (Voima et al., 2013b). У садовой сони во время межбурного бодрствования Хубер и сотр. (Huber et al., 2021) обнаружили значительное (в 30 раз) увеличение количества нейтрофилов и способности их к генерации АФК. Учитывая эти данные, а также существенный рост количества нейтрофилов, обнаруженный нами при  $T_b$  20°C, можно предположить повышение уровня АФК в крови. Недавно мы обнаружили, что во время индуцированного пробуждения малых сусликов от спячки в белках и липидах плазмы крови и эритроцитов происходит значительный рост продуктов окислительной модификации, достигающий максимума при  $T_b$  25°C (Klichkhanov et al., 2021). Однако последующее согревание сусликов до эутермного уровня полностью предотвращает окислительный стресс в крови. В связи с этим можно предположить, что обнаруженное в нашей работе снижение отношения гранулоцитов, представленных в основном зрелыми сегментоядерными нейтрофилами, к лимфоцитам (NEUT/LYM) в период согревания может иметь существенную биологическую значимость. Возможно, оно направлено на снижение рисков избыточной генерации АФК, минимизацию воспаления, а также повреждения органов во время экстремального изменения физиологического состояния животного.

Каковы механизмы столь резких изменений содержания иммунных клеток в крови во время пробуждения сусликов?

Начальная быстрая фаза роста количества лейкоцитов в крови, возможно, связана (1) с выходом их из костного мозга, (2) поступлением из тканей и (3) демаргинацией клеток. Как отмечено выше, костный мозг гибернирующих сусликов в целом содержит меньше клеток, чем костный мозг неспящих животных, но в нем значительно больше доля зрелых гранулоцитов (Szilagy, Senturia, 1972). Во время согревания новообразованные гранулоциты могут быстро высвободиться из костного мозга. Исследования на мышах показали, что в нормальных условиях менее 2% нейтрофильных гранулоцитов находятся в циркулирующем пуле, а оставшаяся часть — в костном мозге. Мыши, на фоне воздействия колониестимулирующего фактора гранулоцитов (G-CSF), достигают высоких скоростей продукции, тем самым увеличивая количество циркулирующих гранулоцитов до  $3 \times 10^9$ /л за 1 час (Eash et al., 2009). По мнению авторов, такой скорости продуцирования было бы достаточно, чтобы суслики увеличили количество циркулирующих гранулоцитов во время

согревания до эутермного уровня. Поскольку, по нашим данным, отношение NEUT/LYM в динамике согревания снижается, это свидетельствует о том, что скорость поступления лимфоцитов в кровь при согревании все же превышает скорость поступления гранулоцитов.

Следует отметить, что низкие температуры тела заметно снижают выброс зрелых и незрелых нейтрофилов из костного мозга в кровоток. Так, у свиней при гипотермии ( $T_b$  29°C) высвобождение нейтрофилов из костного мозга значительно снижено и остается сниженным даже после стимуляции стероидами и бактериальным эндотоксином (Biggar et al., 1983).

Пространственно-временное распределение иммунных клеток сбалансировано между процессами мобилизации клеток в кровяное русло, их адгезии к клеткам стенки сосудистого русла и проникновения в ткани. Важную роль в системной регуляции подвижности лейкоцитов играют катехоламины и глюкокортикоиды (Ince et al., 2019). Во время пробуждения садовой сони от спячки по мере повышения температуры тела в крови возрастает уровень норадреналина и адреналина (Ambid et al., 1990), необходимых для запуска термогенеза бурой жировой тканью (Nedergaard, Cannon, 1984; Cannon, Nedergaard, 2004). Резкий подъем уровня катехоламинов в крови относительно торпидного состояния обнаружен при  $T_b$  23°C. Имеются доказательства того, что катехоламины могут индуцировать перестройку клеточного коркового актина в гранулоцитах, тем самым снижая жесткость клеток и приводя к демаргинации лейкоцитов (Fay et al., 2016). Этим можно объяснить очень быстрое увеличение количества циркулирующих лейкоцитов под действием этих гормонов без необходимости мобилизации из тканей, что позволяет организму реагировать быстро на острые сигналы.

Во время спячки уровень кортизола в крови европейских сусликов (Shivatcheva et al., 1988) и сирийских хомяков (Weitten et al., 2013) низкий, но повышается через несколько часов после пробуждения. Так, через 3.5 ч после пробуждения уровень кортизола в крови европейского суслика (*Citellus citellus*) не увеличивался (Shivatcheva et al., 1988), но через 18–20 ч после пробуждения животных достоверно возрастал (Shivatcheva et al., 1988; Weitten et al., 2013). Эти данные позволяют предположить, что глюкокортикоиды не могут участвовать в демаргинации лейкоцитов во время пробуждения сусликов от спячки, которое занимает  $2.2 \pm 0.2$  ч.

Как свидетельствуют полученные нами данные, количество лимфоцитов в крови существенно увеличивается относительно первой фазы пробуждения ( $T_b$  20°C только после подъема температуры тела до эутермного уровня ( $T_b$  37°C) (рис. 1b). Во время пробуждения от спячки лимфоциты могут поступать в кровь из лимфоидных органов. Аксенова с соавт. (2018) в летний период и в сезон гибернации изучили содержание ядерных клеток селезенки (спленоцитов) сусликов *S. undulatus*, представленных в значительной

степени иммунокомпетентными клетками, в частности лимфоцитами. Оказалось, что при пробуждении сусликов при  $T_b 22.5 \pm 2.9$  °C количество спленоцитов в селезенке достоверно не отличается от их значений у животных в торпидном состоянии (средняя  $T_b = 3.7 \pm 0.6$  °C). Следовательно, выход лимфоцитов из селезенки не играет существенной роли в повышении количества лимфоцитов в крови во время пробуждения сусликов.

Боума с коллегами (Bouma et al., 2011) показали, что в период гибернации и при последующем пробуждении сирийских хомяков количество циркулирующих лимфоцитов значительно коррелирует с уровнем сфингозин-1-фосфата (S1P) в плазме крови. S1P во время пробуждения поступает в кровь преимущественно из эритроцитов, который взаимодействует со своим рецептором ( $S1P_1$ ), что стимулирует выход лимфоцитов из периферических лимфатических узлов. В торпидном состоянии уровень S1P в крови как тринадцатиполосых сусликов (Nelson et al., 2010), так и сирийских хомяков (Bouma et al., 2011) низкий. Как изменяется содержание S1P в крови в динамике пробуждения от спячки, неизвестно, но сразу после восстановления температуры тела до эутермного уровня количество S1P в крови у вышеупомянутых гибернаторов существенно возрастает относительно торпидного состояния. Возможно, именно высокий уровень S1P в крови ответственный за существенное повышение количества циркулирующих лимфоцитов на конечных стадиях пробуждения сусликов.

**Тромбоциты при спячке и пробуждении.** Хотя в период гибернации мелкие грызуны многократно пробуждаются и снова входят в торпор, большую часть времени они находятся в неподвижном состоянии, что представляет повышенный риск тромбоза глубоких вен из-за снижения венозного кровотока, вызывающего гипоксию и последующую активацию эндотелия. Это может создать основу для прилипания тромбоцитов и факторов свертывания крови, запускающих каскад коагуляции и вызывающих образование тромба (Montoro-García et al., 2016). Ожирение перед оцепенением (Martin, 2008), снижение скорости кровотока (Bullard, Funkhouser, 1962) и повышенная вязкость крови (Halikas, Bowers, 1973) в торпидном состоянии также являются факторами риска тромбообразования у гибернирующих животных. Резкое падение уровня тромбоцитов в крови считают одним из главных факторов, предотвращающих тромбообразование при низкой температуре тела в торпидном состоянии (Bouma et al., 2010; Cooper et al., 2012). По нашим данным, после двух месяцев спячки у сусликов, находящихся в торпидном состоянии, в общей циркуляции остается примерно 10% тромбоцитов от их количества у летних эутермных животных (рис. 3а). Эти данные согласуются с результатами, полученными от различных видов сусликов и хомяков в состоянии гибернации (Bouma et al., 2010; Cooper et al., 2012; 2016; de Vrij et al., 2014). Помимо резкого снижения уровня тромбоцитов в торпидном

состоянии у гибернаторов предотвращению тромбообразования также способствует снижение уровня факторов свертывания VIII (FVIII), IX (FIX) и фактора Виллебранта (vWF) (Cooper et al., 2012; 2016b; de Vrij et al., 2014), а также значительное снижение уровня комплекса тромбин-антитромбин (Bonis et al., 2019). Кроме того, в период гибернации у сусликов поддерживается гиперфибринолитическое состояние за счет повышения соотношения комплекса тканевого активатора плазминогена (tPA) и ингибитора активатора плазминогена (PAI-1) к общему количеству ингибитора активатора плазминогена (PAI-1) (Bonis et al., 2019).

Каковы причины столь резкого снижения количества циркулирующих тромбоцитов в крови в торпидном состоянии?

Считают (de Vrij et al., 2014), что снижение количества циркулирующих тромбоцитов во время гибернации и восстановление их уровня после пробуждения происходят из-за аккумуляции и высвобождения маргинированных к стенке сосудов тромбоцитов в хорошо васкуляризованных органах, а не из-за разрушения тромбоцитов и синтеза их *de novo*. Основные аргументы заключаются в том, что количество тромбоцитов быстро нормализуется в течение нескольких часов после пробуждения, т. е. быстрее, чем при синтезе из мегакариоцитов, и что количество вновь синтезированных незрелых тромбоцитов не увеличивается при пробуждении (Cooper et al., 2012; de Vrij et al., 2014). Анализ костного мозга гибернирующих тринадцатиполосых сусликов выявил резкое падение плотности мегакариоцитов (Cooper et al., 2012), что указывает на существенное снижение тромбопоэза во время гибернации.

Известно, что тромбоциты могут обратимо прикрепляться к артериолам, венам и капиллярам посредством маргинации. В торпидном состоянии этому может способствовать значительное снижение сердечного выброса и кровотока (Horwitz et al., 2013), способствующего перемещению тромбоцитов к стенке сосуда (Reasor et al., 2012). Относительная гипоксия во время входа в оцепенение (Cagey et al., 2003) может приводить к экзцитозу телец Вейбеля—Палада эндотелиальных клеток, обнажая P-селектин и высвобождая фактор фон Виллебранда (vWF) (Pinsky et al., 1996), тем самым стимулируя адгезию тромбоцитов к эндотелиальным клеткам. Так, возможно, возрастает местный уровень vWF вблизи эндотелия, хотя его системный уровень в плазме у суслика в торпидном состоянии снижается (Cooper et al., 2016 б). Снижение температуры тела и кровотока может вызывать активацию эндотелия с повышенной экспрессией молекул адгезии (Awad et al., 2013; Li et al., 2014). У торпидных хомяков повышаются некоторые маркеры активации эндотелия (Talaei et al., 2012). Помимо понижения скорости кровотока, факторами, способствующими адгезии тромбоцитов, являются повышение гематокрита (Lechler, Penick, 1963; Spann et al., 2016) и изменение формы

тромбоцитов на сферическую (Reddick et al., 1973, de Vrij et al., 2021), что облегчает их прикрепление к сосудам. Но следует отметить, что, по данным Купера и коллег (Cooper et al., 2012), циркулирующие тромбоциты тринадцатиполосых сусликов в торпидном состоянии изменяют свою форму со сферической на удлиненную путем реорганизации микротрубочек цитоскелета. Следует также отметить, что у малых сусликов (Shihamirova et al., 2020) и тринадцатиполосых сусликов (Hampton et al., 2010; Cooper et al., 2016a) в торпидном состоянии гематокрит не увеличивается. Установлено, что у хомяков в торпидном состоянии на циркулирующих тромбоцитах не обнаружена экспрессия P-селектина, но полагают, что его экспрессия увеличена у маргинированных тромбоцитов (de Vrij et al., 2014).

У гибернирующих сусликов потенциальные места хранения тромбоцитов включают селезенку, легкие и печень, поскольку все три органа способны секвестрировать тромбоциты (Reddick et al., 1973). Дальнейшие исследования показали, что селезенка не участвует в хранении тромбоцитов при спячке, поскольку спленэктомия до входа в торпидное состояние или во время торпора не оказала влияния на динамику тромбоцитов у спящих хомяков (de Vrij et al., 2014) и сусликов (Cooper et al., 2017). Недавно де Врей с коллегами (de Vrij et al., 2021) показали, что у сирийских хомяков в торпидном состоянии тромбоциты аккумулируются в синусоидах печени, но не в селезенке и легких.

Пробуждение сусликов способствует увеличению количества тромбоцитов в крови по сравнению с торпидным состоянием (рис. 3а), что согласуется с результатами других исследователей (Cooper et al., 2012, de Vrij et al., 2021). Повышение уровня тромбоцитов в крови в ходе пробуждения не связано с их новообразованием, поскольку вновь образовавшиеся сетчатые тромбоциты появляются в крови через 48 ч после пробуждения (Cooper et al., 2012). Исследование де Врей и коллег (de Vrij et al., 2021) также не выявило никаких признаков образования тромбоцитов *de novo*, о чем свидетельствовала небольшая доля незрелых тромбоцитов в крови проснувшихся хомяков (De Vrij et al., 2021).

Интересно то, что мы обнаружили наличие достаточно выраженной корреляционной связи между WBC и PLT (рис. 6). Это свидетельствует о том, что на содержание тромбоцитов и лейкоцитов оказывает влияние один и тот же фактор. Учитывая результаты регрессионного анализа, демонстрирующие существенное влияние температуры на данные гематологические параметры (рис. 2 и рис. 4), можно сделать следующий вывод: температура тела животного играет ведущую роль в динамике изменений содержания клеток крови при гибернации.

Мы обнаружили лишь незначительные относительно контроля изменения MPV тромбоцитов (рис. 3b) во время пробуждения сусликов в диапазоне Tb 20—37 °C. Известно, что параметр MPV реагирует

на стимуляцию тромбоцитов или изменение скорости их образования (Мининкова, 2012). Отсутствие повышения объема тромбоцитов в ходе пробуждения может иметь адаптивное значение, поскольку увеличение MPV само по себе увеличивает гемостатический потенциал тромбоцитов, обеспечивая большее взаимодействие их с клеточной стенкой (Chesnutt, Han, 2013). Уровень больших тромбоцитов (P-LCR) является индикатором скорости тромбоцитобразования в костном мозге. Количество P-LCR в ходе пробуждения повышается по сравнению с торпидным состоянием, он тем не менее существенно отстает от уровня контроля (рис. 3d). Отсюда следует, что нормализация числа тромбоцитов во время пробуждения сусликов обусловлена, скорее всего, не повышением скорости их образования в костном мозге, а другими факторами.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение следует отметить, что общее количество лейкоцитов и тромбоцитов у впадающих в спячку малых сусликов резко снижается в торпидном состоянии, в то время как восстановление количества этих клеток в ходе пробуждения полностью завершается еще до того (Tb 30 °C), как полностью восстановится температура тела. В торпидном состоянии в крови резко снижается абсолютное количество всех типов лейкоцитов. В ходе пробуждения повышение уровня циркулирующих лейкоцитов зависит от температуры тела. Резкое повышение содержания всех типов лейкоцитов происходит в диапазоне Tb 10—20 °C, а затем вплоть до Tb 37 °C происходит медленное повышение их уровня. После полного пробуждения абсолютное содержание лимфоцитов и моноцитов в крови значительно превосходит их уровень у контрольных животных, но содержание нейтрофилов не восстанавливается. Объем циркулирующих тромбоцитов (MPV) и диапазон их распределения по объему (PDW) в торпидном состоянии и в динамике пробуждения не меняются, но значение тромбокриты (PCT) меняется с изменением температуры тела соответственно изменению общего количества тромбоцитов. Доля гигантских (>12 мкм) тромбоцитов (P-LCR) в торпидном состоянии значительно снижена, и их количество не нормализуется после пробуждения. Это говорит о том, что восстановление уровня тромбоцитов во время пробуждения происходит не за счет их новообразования, а из-за освобождения из мест их хранения. Выяснение путей, приводящих к снижению иммунной функции во время гибернации, и особенностей ее восстановления во время пробуждения улучшит наше понимание иммунологических реакций во время экстремальных физиологических изменений у млекопитающих. Знание механизма тромбоцитопении в торпидном состоянии и ее последующее восстановление во время пробуждения может привести к новому пониманию ингибирования

функции тромбоцитов или продления срока их хранения при гипотермических условиях.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и были одобрены Комиссией по биоэтике (Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Протокол № 5/2021 от 27.05.2021).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов, связанных с публикацией данной статьи.

### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не получило внешнего финансирования и выполнено на личные средства авторов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аксенова Г.Э., Логвинович О.С., Игнатъев Д.А., Коломийцева И.К. Динамика адаптивных изменений в селезенке гибернарующих сусликов *Spermophilus undulates* // Биофизика. 2018. Т. 63. В. 2. С. 311—317.
- Колаева С.Г., Новоселова Е.Г., Амерханов З.Г., Куликов А.В., Ивков В.Г. Ежегодная инволюция и регенерация тимуса у зимнеспящих и перспективы ее исследований в области геронтологии и пролиферации стволовых клеток // Цитология. 2003. Т. 45. № 7. С. 628—634.
- Кузнецова Е.В. Эколого-физиологические адаптации представителей подсемейства *Cricetinae* к осенне-зимним условиям: Дис. канд. биол. наук по специальности 03.02.04 — зоология. Москва, 2019. 141 с.
- Мининкова А.И. Аналитические возможности гематологических анализаторов в оценке тромбоцитов (обзор литературы) // Клинич. лаб. диагн. 2012. № 3. С. 27—34.
- Новоселова Е.Г., Куликов А.В., Глушкова О.В., Черников Д.А., Смирнова Г.Н., Архипова Л.В. Влияние трансплантации тимуса зимнеспящих сусликов на возрастную инволюцию вилочковой железы стареющих крыс // Докл. Академии наук. 2004. Т. 397. № 2. С. 279—280.
- Узенбаева Л.Б., Белкин В.В., Илюха В.А., Кижина А.Г., Якимова А.Е. Особенности состава и морфологии клеток периферической крови у трех видов летучих мышей Карелии в период зимней спячки // Журн. эволюц. биохим. физиол. 2015. Т. 51. № 4. С. 299—304.
- Ambid L., Castan I., Atgié C.L., Nibbelink M. Food intake and peripheral adrenergic activity in a hibernating rodent, the garden dormouse // *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol.* 1990. V. 97. № 3. P. 361—366. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(90\)90624-2](https://doi.org/10.1016/0300-9629(90)90624-2)
- Atanassov C.L., Naegeli H.U., Zenke G., Schneider C., Kramarova L.I., Bronnikov G.E., Van Regenmortel M.H. Anti-lymphoproliferative activity of brown adipose tissue of hibernating ground squirrels is mainly caused by AMP // *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol.* 1995. V. 112. № 1. P. 93—100. DOI: 10.1016/0742-8413(95)00000-3
- Awad E.M., Khan S.Y., Sokolikova B., Brunner P.M., Olcaydu D., Wojta J., Breuss J.M., Uhrin P. Cold induces reactive oxygen species production and activation of the NF-kappa B response endothelial cells and inflammation in vivo // *J. Thromb. Haemost.* 2013. V. 11. P. 1716—1726. DOI: 10.1111/jth.12357
- Barker J.M., Boonstra R. Preparing for winter: Divergence in the summer—autumn hematological profiles from representative species of the squirrel family // *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integ. Physiol.* 2005. V. 142. № 1. P. 32—42. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.07.003>.
- Basu S., Hodgson G., Katz M., Dunn A.R. Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation // *Blood, J. Am. Soc. Hematol.* 2002. V. 100. № 3. P. 854—861. DOI: 10.1182/blood.v100.3.854
- Biggar W.D., Bohn D.E., Kent G.E. Neutrophil circulation and release from bone marrow during hypothermia // *Infection and Immunity.* 1983. V. 40. № 2. P. 708—712. doi: 10.1128/iai.40.2.708-712.1983
- Bogren L.K., Drew K.L. Ischemia/reperfusion injury resistance in hibernators is more than an effect of reduced body temperature or winter season // *Temperature.* 2014. V. 1. № 2. P. 87—88. doi: 10.4161/temp.29761
- Bonis A., Anderson L., Talhouarne G., Schueller E., Unke J., Krus C., Stokka J., Koepke A., Lehr B., Schuh A., Andersen J.J., Cooper S. Cardiovascular resistance to thrombosis in 13-lined ground squirrels // *J. Comp. Physiol. B.* 2019. V. 189. P. 167—177. DOI: 10.1007/s00360-018-1186-x
- Bouma H.R., Carey H.V., Kroese F.G.M. Hibernation: the immune system at rest? // *J. Leukoc. Biol.* 2010a. V. 88. P. 619—624. DOI: 10.1189/jlb.0310174
- Bouma H.R., Strijkstra A.M., Boerema A.S., Deelman L.E., Epema A.H., Hut R.A., Kroese F.G.M., Henning R.H. Blood cell dynamics during hibernation in the European Ground Squirrel // *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010b. V. 136. P. 319—323. DOI: 10.1016/j.vetimm.2010.03.016
- Bouma H.R., Dugbartey G.J., Boerema A.S., Talaie F., Herwig A., Goris M., van Buiten A., Strijkstra A.M., Carey H.V., Henning R.H., Kroese F.G.M. Reduction of

- body temperature governs neutrophil retention in hibernating and nonhibernating animals by margination // *J. Leukoc. Biol.* 2013a. V. 94. № 3. P. 431—437. DOI: 10.1189/jlb.0611298
- Bouma H.R., Henning R.H., Kroese F.G.M., Carey H.V.* Hibernation is associated with depression of T-cell independent humoral immune responses in the 13-lined ground squirrel // *Dev. Comp. Immunol.* 2013b. V. 39. P. 154—160. DOI: 10.1016/j.dci.2012.11.004
- Bouma H.R., Kroese F.G., Kok J.W., Talaei F., Boerema A.S., Herwig A., Draghiciu O., van Buiten A., Epe-ma A.H., van Dam A., Strijkstra A.M., Henning R.H.* Low body temperature governs the decline of circulating lymphocytes during hibernation through sphingosine-1-phosphate // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2011. V. 108. № 5. P. 2052—2057. DOI: 10.1073/pnas.1008823108
- Bullard R.W., Funkhouser G.E.* Estimated regional blood flow by rubidium 86 distribution during arousal from hibernation // *Am. J. Physiol.* 1962. V. 203. P. 266—270. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1962.203.2.266>
- Burton R.S., Reichman O.J.* Does immune challenge affect torpor duration? // *Funct. Ecol.* 1999. V. 13. P. 232—237. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1999.00302.x>
- Cannon B., Nedergaard J.* Brown adipose tissue: function and physiological significance // *Physiol. Rev.* 2004. V. 84. P. 277—359. DOI: 10.1152/physrev.00015.2003
- Carey H.V., Andrews M.T., Martin S.L.* Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature // *Physiol. Rev.* 2003. V. 83. P. 1153—1181. DOI: 10.1152/physrev.00008.2003
- Chesnutt J.K., Han H.C.* Platelet size and density affect shear-induced thrombus formation in tortuous arterioles // *Phys. Biol.* 2013. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2013.00018>
- Cooper S.T., Richters K.E., Melin T.E., Liu Z.J., Hordyk P.J., Benrud R.R., Geiser L.R., Cash S.E., Simon Shelley C., Howard D.R., Ereth M.H., Sola-Visner M.C.* The hibernating 13-lined ground squirrel as a model organism for potential cold storage of platelets // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2012. V. 302. P. 1202—1208. DOI: 10.1152/ajpregu.00018.2012
- Cooper S.T., Sell S.S., Nelson L., Hawes J., Benrud J.A., Kohlnhofer B.M., Burmeister B.R., Flood V.H.* Von Willebrand factor is reversibly decreased during torpor in 13-lined ground squirrels // *J. Comp. Physiol. B.* 2016a. V. 186. P. 131—139. DOI: 10.1007/s00360-015-0941-5
- Cooper S.T., Sell S.S., Fahrenkrog M., Wilkinson K., Howard D.R., Bergen H., Cruz E., Cash S.E., Andrews M.T., Hampton M.* Effects of hibernation on bone marrow transcriptome in thirteen-lined ground squirrels // *Physiol. Genomics.* 2016b. V. 48. № 7. P. 513—525. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00120.2015
- Cooper S., Lloyd S., Koch A., Lin X., Dobbs K., Theisen T., Zuberbuehler M., Bernhardt K., Gyorfı M., Tenpas T., Hying S., Mortimer S., Lamont C., Lehmann M., Neeves K.* Temperature effects on the activity, shape, and storage of platelets from 13-lined ground squirrels // *J. Comp. Physiol. B.* 2017. V. 187. P. 815—825. DOI: 10.1007/s00360-017-1081-x
- Dahlgren C., Karlsson A.* Respiratory burst in human neutrophils // *J. Immunol. Methods.* 1999. V. 232. P. 3—14. DOI: 10.1016/s0022-1759(99)00146-5
- de Vrij E.L., Vogelaar P.C., Goris M., Houwertjes M.C., Herwig A., Dugbartey G.J., Boerema A.S., Strijkstra A.M., Bouma H.R., Henning R.H.* Platelet dynamics during natural and pharmacologically induced torpor and forced hypothermia // *PLOS ONE.* 2014. V. 9. № 4. doi: 10.1371/journal.pone.0093218
- de Vrij E.L., Bouma H.R., Goris M., Weerman U., de Groot A.P., Kuipers J., Giepmans B.N.G., Henning R.H.* Reversible thrombocytopenia during hibernation originates from storage and release of platelets in liver sinusoids // *J. Comp. Physiol. B.* 2021. V. 191. № 3. P. 603—615. DOI: 10.1007/s00360-021-01351-3
- Dinauer M.C.* Neutrophil defects and diagnosis disorders of neutrophil function: an overview // *Neutrophil: Methods and Protocols* / Eds Quinn M. T., DeLeo F.R. NY.: Springer US, 2020. P. 11—29. DOI: 10.1007/978-1-0716-0154-9\_2
- Eash K.J., Greenbaum A.M., Gopalan P.K., Link D.C.* CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow // *J. Clin. Invest.* 2010. V. 120. P. 2423—2431. DOI: 10.1172/JCI41649
- Eash K.J., Means J.M., White D.W., Link D.C.* CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions // *Blood.* 2009. V. 113. P. 4711—4719. DOI: 10.1182/blood-2008-09-177287
- Fay M.E., Myers D.R., Kumar A., Turbyfield C.T., Byler R., Crawford K., et al.* Cellular softening mediates leukocyte demargination and trafficking, thereby increasing clinical blood counts // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. P. 1987—1992. DOI: 10.1073/pnas.1508920113
- Franco M., Contreras C., Nespolo R.F.* Profound changes in blood parameters during torpor in a South American marsupial // *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 2013. V. 166. № 2. P. 338—342. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.07.010
- Frerichs K.U., Kennedy C., Sokoloff L., Hallenbeck J.M.* Local cerebral blood flow during hibernation, a model of natural tolerance to “cerebral ischemia” // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1994. V. 14. P. 193—205. DOI: 10.1038/jcbfm.1994.26
- Furth R.V., Cohn Z.A.* The origin and kinetics of mononuclear phagocytes // *J. Exp. Med.* 1968. V. 128. P. 415—435. DOI: 10.1084/jem.128.3.415
- Galletti G., Cavallari A.* The thymus of marmots: spontaneous, natural seasonal thymectomy? // *Acta Anat. (Basel).* 1972. V. 83. P. 593—605. DOI: 10.1159/000143901
- Geiser F.* Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor // *Annu. Rev. Physiol.* 2004. V. 66. P. 239—274. DOI: 10.1146/annurev.physiol.66.032102.115105

- Ghasemzadeh M., Hosseini E.* Platelet-leukocyte crosstalk: linking proinflammatory responses to procoagulant state // *Thromb. Res.* 2013. V. 131. P. 191—197. DOI: 10.1016/j.thromres.2012.11.028
- Halikas G., Bowers K.* Seasonal variation in blood viscosity of the hibernating arctic ground squirrel (*Spermophilus undulatus plesius*) // *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol.* 1973. V. 44. № 2. P. 677—681. DOI: 10.1016/0300-9629(73)90522-7
- Hampton M., Nelson B.T., Andrews M.T.* Circulation and metabolic rates in a natural hibernator: an integrative physiological model // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2010. V. 299. P. 1478—1488. DOI: 10.1152/ajpregu.00273.2010
- Havenstein N., Langer F., Stefanski V., Fietz J.* It takes two to tango: Phagocyte and lymphocyte numbers in a small mammalian hibernator // *Brain Behav. Immun.* 2016. V. 52. P. 71—80. DOI: 10.1016/j.bbi.2015.09.018
- Horwitz B.A., Chau S.M., Hamilton J.S., Song C., Gorgone J., Saenz M., Horowitz J.M., Chen C.Y.* Temporal relationships of blood pressure, heart rate, baroreflex function, and body temperature change over a hibernation bout in Syrian hamsters // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2013. V. 305. P. 759—768. DOI: 10.1152/ajpregu.00450.2012
- Hu H.X., Du F.Y., Fu W.W., Jiang S.F., Cao J., Xu S.H., Wang H.P., Chang H., Goswami N., Gao Y.F.* A dramatic blood plasticity in hibernating and 14-day hindlimb unloading Daurian ground squirrels (*Spermophilus dauricus*) // *J. Comp. Physiol. B.* 2017. V. 187. P. 869—879. DOI: 10.1007/s00360-017-1092-7
- Huber N., Vetter S., Stalder G., Gerritsmann H., Giroud S.* Dynamic function and composition shift in circulating innate immune cells in hibernating garden dormice // *Front. Physiol.* 2021. V. 12. doi: 10.3389/fphys.2021.620614
- Ince L.M., Weber J., Scheiermann C.* Control of leukocyte trafficking by stress-associated hormones // *Front. Immunol.* 2019. V. 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.03143
- Inkovaara P., Suomalainen P.* Studies on the physiology of the hibernating hedgehog. On the leukocyte counts in the hedgehog's intestine and lungs // *Ann. Acad. Sci. Fenn. Biol.* 1973. V. 200. P. 1—21. PMID: 4788806
- Jacobs S.E., Berg M., Hunt R., Tarnow-Mordi W.O., Inder T.E., Davis P.G.* Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2013. V. 31. doi: 10.1002/14651858.CD003311.pub3
- Jaroslaw B.N., Serrell B.A.* Differential sensitivity to hibernation of early and late events in development of the immune response // *J. Exp. Zool.* 1972. V. 181. P. 111—116. https://doi.org/10.1002/jez.1401810112
- Kandefer-Szerszen M.* Interferon production in leukocytes of spotted sousliks — effect of hibernation on the interferon response in vitro // *J. Interferon Res.* 1988. V. 8. P. 95—103. DOI: 10.1089/jir.1988.8.95
- Kizhina A., Uzenbaeva L., Antonova E., Belkin V., Ilyukha V., Khizhkin E.* Hematological parameters in hibernating *Eptesicus nilssonii* (Mammalia: Chiroptera) collected in Northern European Russia // *Acta Chiropterol.* 2018. V. 20. P. 273—283. DOI: 10.3161/15081109ACC2018.20.1.021
- Klichkhanov N.K., Nikitina E.R., Shihamirova Z.M., Astaeva M.D., Chalabov Sh.I., Krivchenko A.I.* Erythrocytes of little ground squirrels undergo reversible oxidative stress during arousal from hibernation // *Front. Physiol.* 2021. V. 12. doi: 10.3389/fphys.2021.730657
- Kurtz C.C., Carey H.V.* Seasonal changes in the intestinal immune system of hibernating ground squirrels // *Dev. Comp. Immunol.* 2007. V. 31. P. 415—428. https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.07.003
- Kurtz C.C., Lindell S.L., Mangino M.J., Carey H.V.* Hibernation confers resistance to intestinal ischemia-reperfusion injury // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2006. V. 291. № 5. P. 895—901. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00155.2006
- Lechler E., Penick G.D.* Blood clotting defect in hibernating ground squirrels (*Citellus tridecemlineatus*) // *Am. J. Physiol.* 1963. V. 205. P. 985—988. https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1963.205.5.985
- Li R., Zijlstra J.G., Kamps J.A., van Meurs M., Molema G.* Abrupt reflow enhances cytokine-induced proinflammatory activation of endothelial cells during simulated shock and resuscitation // *Shock.* 2014. V. 42. № 4. P. 356—364. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000223
- Lilliehöök I., Tvedten H.* Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts // *Vet. Clin. Pathol.* 2009. V. 38. № 2. P. 163—174. https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00125.x
- Mallet M.L.* Pathophysiology of accidental hypothermia // *QJM: Int. J. Med.* 2002. V. 95. P. 775—785. https://doi.org/10.1093/qjmed/95.12.775
- Maniero G.D.* Classical pathway serum complement activity throughout various stages of the annual cycle of a mammalian hibernator, the golden-mantled ground squirrel *Spermophilus lateralis* // *Dev. Comp. Immunol.* 2002. V. 26. P. 563—574. https://doi.org/10.1016/S0145-305X(02)00006-X
- Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C., Jaillon S.* Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity // *Nat. Rev. Immunol.* 2011. V. 11. P. 519—531. DOI: https://doi.org/10.1038/nri3024
- Martin S.L.* Mammalian hibernation: a naturally reversible model for insulin resistance in man? // *Diab. Vasc. Dis. Res.* 2008. V. 5. P. 76—81. https://doi.org/10.3132/dvdr.2008.013
- McArthur M.D., Milsom W.K.* Changes in ventilation and respiratory sensitivity associated with hibernation in Columbian (*Spermophilus columbianus*) and golden-mantled (*Spermophilus lateralis*) ground squirrels // *Physiol. Zool.* 1991. V. 64. № 4. P. 940—959. https://www.jstor.org/stable/30157950
- McCarron R.M., Sieckmann D.G., Yu E.Z., Frerichs K., Hallenbeck J.M.* Hibernation, a state of natural tolerance to profound reduction in organ blood flow and oxygen delivery capacity // *In Molecular Mechanisms*

- of Metabolic Arrest / Ed. Storey K. B.; Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2001. P. 23—42.
- Miglis M., Wilder D., Reid T., Bakaltcheva I. Effect of taurine on platelets and the plasma coagulation system // *Platelets*. 2002. V. 13. P. 5—10. <https://doi.org/10.1080/09537100120112558>
- Montoro-García S., Schindewolf M., Stanford S., Larsen O.H., Thiele T. The role of platelets in venous thromboembolism // In *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2016. Vol. 42. № 3. P. 242—251. DOI: 10.1055/s-0035-1570079
- Muleme H.M., Walpole A.C., Staples J.F. Mitochondrial metabolism in hibernation: metabolic suppression, temperature effects, and substrate preferences // *Physiol. Biochem. Zool.* 2006. V. 79. № 3. P. 474—483. <https://doi.org/10.1086/501053>
- Nedergaard J., Cannon B. Preferential utilization of brown adipose tissue lipids during arousal from hibernation in hamsters // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1984. V. 247. P. 506—512. DOI: 10.1152/ajpregu.1984.247.3.R506
- Nelson C.J., Otis J.P., Carey H.V. Global analysis of circulating metabolites in hibernating ground squirrels // *Comp. Biochem. Physiol. Part D: Genomics Proteomics*. 2010. V. 5. № 4. P. 265—273. DOI: 10.1016/j.cbd.2010.07.002
- Novoselova E.G., Kolaeva S.G., Makar V.R., Agaphonova T.A. Production of tumor necrosis factor in cells of hibernating ground squirrels *Citellus undulatus* during annual cycle // *Life Sci.* 2000. V. 67. P. 1073—1080. DOI: 10.1016/s0024-3205(00)00698-6
- Otis J.P., Pike A.C., Torrealba J.R., Carey H.V. Hibernation reduces cellular damage caused by warm hepatic ischemia—reperfusion in ground squirrels // *J. Comp. Physiol. B*. 2017. V. 187. P. 639—648. DOI: 10.1007/s00360-017-1056-y
- Parretta E., Cassese G., Santoni A., Guardiola J., Vecchio A., Di Rosa F. Kinetics of in vivo proliferation and death of memory and naive CD8 T cells: parameter estimation based on 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation in spleen, lymph nodes, and bone marrow // *J. Immunol.* 2008. V. 180. P. 7230—7239. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.11.7230>
- Pinsky D.J., Naka Y., Liao H., Oz M.C., Wagner D.D., Mayadas T.N., Johnson R.C., Hynes R.O., Heath M., Lawson C.A., Stern D.M. Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel—Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation // *J. Clin. Invest.* 1996. № 97. P. 493—500. doi: 10.1172/JCI118440
- Pivorun E.B., Sinnamon W.B. Blood coagulation studies in normothermic, hibernating, and aroused *Spermophilus franklini* // *Cryobiol.* 1981. V. 18. P. 515—520. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(81\)90212-1](https://doi.org/10.1016/0011-2240(81)90212-1)
- Prendergast B.J., Freeman D.A., Zucker I., Nelson R.J. Periodic arousal from hibernation is necessary for initiation of immune responses in ground squirrels // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2002. V. 282. P. 1054—1062. DOI: 10.1152/ajpregu.00562.2001
- Reasor D.A.Jr., Mehrabadi M., Ku D.N., Aidun C.K. Determination of critical parameters in platelet margination // *Ann. Biomed. Eng.* 2012. V. 41. P. 238—249. <https://doi.org/10.1007/s10439-012-0648-7>
- Reddick R.L., Poole B.L., Penick G.D. Thrombocytopenia of hibernation. Mechanism of induction and recovery // *Lab. Invest.* 1973. V. 28. P. 270—278. PMID: 4687533
- Reitsemá V.A., Oosterhof M.M., Henning R.H., Bouma H.R. Phase specific suppression of neutrophil function in hibernating Syrian hamster // *Develop. Comp. Immunol.* 2021. V. 119. doi: 10.1016/j.dci.2021.104024.
- Reznik G., Reznik-Schuller H., Emminger A., Mohr U. Comparative studies of blood from hibernating and nonhibernating European hamsters (*Cricetus cricetus* L) // *Lab. Animal Sci.* 1975. V. 25. P. 210—215. PMID: 1134037
- Sahdo B., Evans A.L., Arnemo J.M., Frobert O., Sarnadahl E., Blanc S. Body temperature during hibernation is highly correlated with a decrease in circulating innate immune cells in the brown bear (*Ursus arctos*): a common feature among hibernators? // *Int. J. Med. Sci.* 2013. V. 10. doi: 10.7150/ijms.4476.
- Saunders D.K., Roberts A.C., Ultsch G.R. Blood viscosity and hematological changes during prolonged submergence in normoxic water of northern and southern musk turtles (*Sternotherus odoratus*) // *J. Exp. Zool.* 2000. V. 287. P. 459—466. [https://doi.org/10.1002/1097-010X\(20001201\)287:7<459::AID-JEZ1>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-010X(20001201)287:7<459::AID-JEZ1>3.0.CO;2-6)
- Shihamirova Z.M., Dzhaifarova A.M., Klichkhanov N.K. Hematological characteristics and erythrokinetic indices in little ground squirrels during arousal from hibernation // *Probl. Cryobiol. Cryomed.* 2020. V. 30. № 2. P. 132—147. DOI: 10.15407/cryo30.02.132
- Shivatcheva T.M., Ankov V.K., Hadjioloff A.I. Circannual fluctuations of the serum cortisol in the European ground squirrel, *Citellus citellus* L // *Comp. Biochem. Physiol. A. Comp. Physiology.* 1988. V. 90. № 3. P. 515—518. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(88\)90229-0](https://doi.org/10.1016/0300-9629(88)90229-0)
- Sidky Y.A., Auerbach R. Effect of hibernation on the hamster spleen immune reaction in vitro // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1968. № 129. P. 122—127. DOI: 10.3181/00379727-129-33265
- Spann A.P., Campbell J.E., Fitzgibbon S.R., Rodriguez A., Cap A.P., Blackburne L.H., Shaqfeh E.S.G. The effect of hematocrit on platelet adhesion: experiments and simulations // *Biophysical J.* 2016. V. 111. № 3. P. 577—588. doi: 10.1016/j.bpj.2016.06.024
- Sprent J. Circulating T and B lymphocytes of the mouse. I. Migratory properties // *Cell Immunol.* 1973. V. 7. P. 10—39. DOI: 10.1016/0008-8749(73)90180-9
- Sprent J. Lifespans of naive, memory and effector lymphocytes // *Curr. Opin. Immunol.* 1993. V. 5. P. 433—438. DOI: 10.1016/0952-7915(93)90065-z
- Spurrier W.A., Dawe A.R. Several blood and circulatory changes in the hibernation of the 13-lined ground squirrel, *Citellus tridecemlineatus* // *Comp. Biochem.*

- Physiol. A. Comp. Physiol. 1973. V. 44. P. 267—282. DOI: 10.1016/0300-9629(73)90479-9
- Straub A., Krajewski S., Hohmann J.D., Westein E., Jia F., Bassler N., Selan C., Kurz J., Wendel H.P., Dezfouli S., Yuan Y., Nandurkar H., Jackson S., Hickey M.J., Peter K.* Evidence of platelet activation at medically used hypothermia and mechanistic data indicating ADP as a key mediator and therapeutic target // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011. V. 31. P. 1607—1616. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.226373
- Szilagy J.E., Senturia J.B.* A comparison of bone marrow leukocytes in hibernating and nonhibernating woodchucks and ground squirrels // *Cryobiol.* 1972. V. 9. P. 257—261. DOI: 10.1016/0011-2240(72)90044-2
- Talaei F., Bouma H.R., Hylkema M.N., Strijkstra A.M., Boerema A.S., Schmidt M., Henning R.H.* The role of endogenous H<sub>2</sub>S formation in reversible remodeling of lung tissue during hibernation in the Syrian hamster // *J. Exp. Biol.* 2012. V. 215. P. 2912—2919. DOI: 10.1242/jeb.067363
- Thiele J.R., Zeller J., Kiefer J., Braig D., Kreuzaler S., Lenz Y., Potempa L.A., Grahammer F., Huber T.B., Huber-Lang M., Bannasch H., Stark G.B., Peter K., Eisenhardt S.U.* A conformational change in C-reactive protein enhances leukocyte recruitment and reactive oxygen species generation in ischemia/reperfusion injury // *Front. Immunol.* 2018. V. 9. P. 675. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00675>
- Tøien Ø., Drew K.L., Chao M.L., Rice M.E.* Ascorbate dynamics and oxygen consumption during arousal from hibernation in Arctic ground squirrels // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2001. V. 281. P. 572—583. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.281.2.R572>
- Uzenbaeva L.B., Kizhina A.G., Ilyukha V.A., Belkin V.V., Khizhkin E.A.* Morphology and composition of peripheral blood cells during hibernation in bats (Chiroptera, Vespertilionidae) of Northwestern Russia // *Biol. Bull.* 2019. V. 46. P. 398—406. DOI: 10.1134/S1062359019030130
- Wang C.H., Chen N.C., Tsai M.S., Yu P.H., Wang A.Y., Chang W.T., Huang C.H., Chen W.J.* Therapeutic hypothermia and the risk of hemorrhage: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // *Medicine (Baltimore)*. 2015. V. 94. P. 2152. doi: 10.1097/MD.0000000000002152
- Weitten M., Robin J.P., Oudart H., Pévet P., Habold C.* Hormonal changes and energy substrate availability during the hibernation cycle of Syrian hamsters // *Hormon. Behavior*. 2013. V. 64. № 4. P. 611—617. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2013.08.015
- Yasuma Y., McCarron R.M., Spatz M., Hallenbeck J.M.* Effects of plasma from hibernating ground squirrels on monocyte-endothelial cell adhesive interactions // *Am. J. Physiol.-Regul., Integr. Comp. Physiol.* 1997. V. 273. № 6. P. 1861—1869. DOI: 10.1152/ajpregu.1997.273.6.R1861

## The blood leukocytes and platelets of little ground squirrels (*Spermophilus pygmaeus* Pall.) during hibernation and arousal

© 2024 A. M. Dzhaferova\*, Sh. I. Chalabov\*\*, N. K. Klichkhanov\*, #

\*Dagestan State University, st. M. Gadzhieva, 43a, Makhachkala, Republic of Dagestan, 367000 Russia

\*\*I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Torez Ave, 44, St. Petersburg, 194223 Russia

#E-mail: klich-khan@mail.ru

During hibernation, mammals periodically go through cold (torpor) and warm (awakening) phases. Previously, a sharp decrease in the levels of leukocytes and blood platelets in the torpid state was found, but the dynamics of their changes during arousal remains unknown. We have studied the content and composition of the circulating cells of the little ground squirrel during arousal. The number of all types of leukocytes and platelets in the torpid state is significantly reduced. Restoration of the level of leukocytes in the blood during arousal occurs in two phases: fast (Tb 10—20°C) and slow (Tb 20—37°C). Unlike other cell types, the content of neutrophils remains below eutherma condition after body temperature recovery. During arousal in the Tb range of 10—30°C, the level of platelets increases linearly, while the normalization of the P-LCR parameter does not occur.

*Keywords:* ground squirrels, hibernation, awakening, leukocytes, platelets.

УДК 577.352.53

## КАЛЬЦИЙ-АКТИВИРУЕМЫЕ ХЛОРНЫЕ КАНАЛЫ: РОЛЬ ИОНОВ КАЛИЯ

© 2024 г. В. Л. Замоийский\*, А. В. Габрельян\*, В. В. Григорьев\*

\*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Институт физиологически активных веществ РАН”,  
Северный проезд, 1, г. Черноголовка, Московская область, 142432 Россия

@E-mail: vzam@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.05.2022

После доработки 21.11.2023

Принята к публикации 22.11.2023

Методом patch-clamp в конфигурации whole-cell показано, что концентрация ионов калия с наружной стороны мембраны клетки играет важную роль в регулировании кальций-активируемых хлорных токов. Показана зависимость амплитуды и направления трансмембранного движения хлорных токов от изменений концентрации калия с наружной стороны мембраны. Изменение концентрации катионов натрия, магния и кальция с наружной стороны мембраны не оказывало сопоставимого эффекта на эти хлорные токи. При этом влияние, оказываемое калием на амплитуды хлорных токов, было существенно больше, чем влияние, оказываемое им на другие потенциалозависимые ионные токи в клетке: натриевые, калиевые, катионные. Эти результаты дают основания предполагать, что изменение амплитуд хлорных токов может вносить свой вклад в патофизиологические процессы, характерные для гипокалиемии и гиперкалиемии.

**Ключевые слова:** кальций-активируемые хлорные каналы (КАХК), клетки Пуркиньи мозжечка, ионы калия, ионы цезия, метод patch-clamp.

**DOI:** 10.31857/S1026347024030082, **EDN:** VAJJDC

Вопрос регуляции кальций-активируемых хлорных каналов (КАХК) является весьма актуальным в свете значительного участия КАХК во многих важнейших физиологических и патофизиологических процессах в организме млекопитающих, в том числе и человека. КАХК опосредуют секрецию  $Cl^-$  в секреторных эпителиях, таких как дыхательные пути, слюнные железы, кишечник, почечные канальцы и потовые железы. Наличие КАХК установлено также в гладких мышцах дыхательных путей и сосудов, где они контролируют тонус сосудов и гиперчувствительность дыхательных путей. Доказана роль КАХК в механизмах гипертонии, астмы, муковисцидоза, ноцицепции, нарушении функционирования желудочно-кишечного тракта, патологии уретры — Кунцельман с соавт., Камаледдин, Джи с соавт. (Kunzelmann *et al.*, 2011; Kamaledin, 2018; Ji *et al.*, 2019; Григорьев, 2021). Хотя установлены некоторые механизмы взаимодействия КАХК с различными клеточными сигнальными путями, включающими рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК), кальмодулин-регулируемые киназы (CaM), трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) — Кроттес и Ян (Crottès, Jan, 2019), многие другие возможные механизмы регуляции КАХК остаются неисследованными.

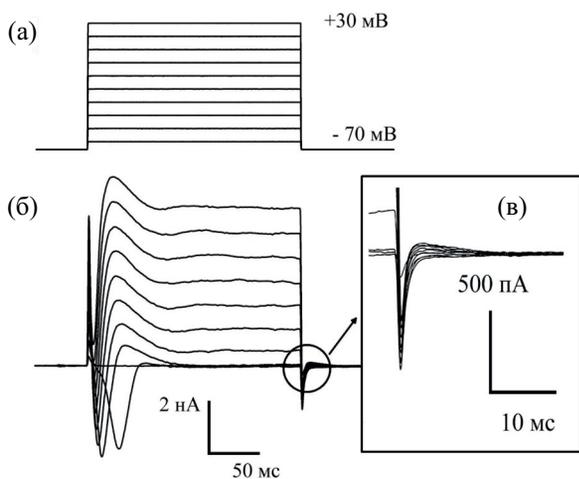
Целью данной работы было исследование роли эндогенных электролитов, а именно ионов калия, в регуляции токов КАХК. Калий был выбран в связи с тем, что он играет важнейшую роль в физиологических процессах и даже незначительные изменения в концентрации его ионов в крови или спинномозговой жидкости приводят к весьма существенным патофизиологическим процессам, описываемым терминами “гипокалиемия” и “гиперкалиемия”.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования осуществляли электрофизиологическим методом на свежевыделенных нейронах Пуркиньи из мозжечка мозга крыс самцов (12–15 дней) линии Вистар. Выделение единичных нейронов проводили ферментно-механическим способом Канада с соавт. (Kaneda *et al.*, 1988). Трансмембранные токи отдельных нервных клеток регистрировали методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации на целой клетке (whole-cell) Хэмилл с соавт. (Hamill *et al.*, 1981) с помощью прибора ЕРС-9 (НЕКА, Германия). Такой метод позволяет регистрировать суммарный (интегральный) токовый ответ клетки. Данные обрабатывали при помощи программы Pulsfit (НЕКА, Германия).

В экспериментах при потенциале фиксации на мембране клетки ( $-70$  мВ) использовали физиологический раствор, содержащий 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ  $MgCl_2$ , 2 мМ  $CaCl_2$ , 10 мМ HEPES, (pH 7,36), осмолярность 305—315 мосм; внешний раствор без натрия содержал: 140 мМ Трис-HCl, 5 мМ KCl, 2 мМ  $MgCl_2$ , 2 мМ  $CaCl_2$ , 10 мМ HEPES (pH 7,36), осмолярность 305—315 мосм. В микропипетке — электроде — использованы два варианта растворов: 1) 120 мМ KCl, 2 мМ  $MgCl_2$ , 11 мМ EGTA, 10 мМ HEPES, 5 мМ  $K_2ATP$  (pH 7,2), осмолярность 285—295 мосм и 2) 120 мМ CsCl, 2 мМ  $MgCl_2$ , 11 мМ EGTA, 10 мМ HEPES, 5 мМ  $K_2ATP$  (pH 7,2), осмолярность 285—295 мосм. Растворы с концентрациями наружного калия в 9 и 15 мМ готовили из стандартного наружного раствора добавлением соответствующего количества 1 М раствора KCl. Раствор с 0 мМ наружного KCl готовили по прописи наружного раствора, без добавления KCl. Из этого раствора также готовили растворы с CsCl, добавляя необходимые количества 1 М раствора CsCl.

На рис. 1 показана запись протокола получения интегрального ответа электровозбудимых токов клетки (б) на серию деполяризующих импульсов (а) с шагом 10 мВ, от потенциала фиксации ( $-70$  мВ) до  $+30$  мВ на мембране клетки. Условия регистрации: в пипетке ВПР с калием, снаружи — стандартный физиологический раствор. Токи, активирующиеся «вниз» сразу после подачи импульса, на рис. 1, б — входящие в клетку токи (натриевые и кальциевые); токи, активирующиеся «вверх» на протяжении действия импульса, — выходящие калиевые и катионные токи; небольшие токи, активирующиеся по окончании импульса, направленные «вверх», — входящие кальций-активируемые хлорные токи (показаны с увеличением на рис. 1в).



**Рис. 1.** а — серия деполяризующих импульсов, подаваемых на клетку, от потенциала фиксации ( $-70$  мВ), с шагом в 10 мВ, до  $+30$  мВ на мембране, в конфигурации whole-cell; б — зарегистрированный ответ токов клетки на деполяризующие импульсы; в — токи, появляющиеся по окончании деполяризующих импульсов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

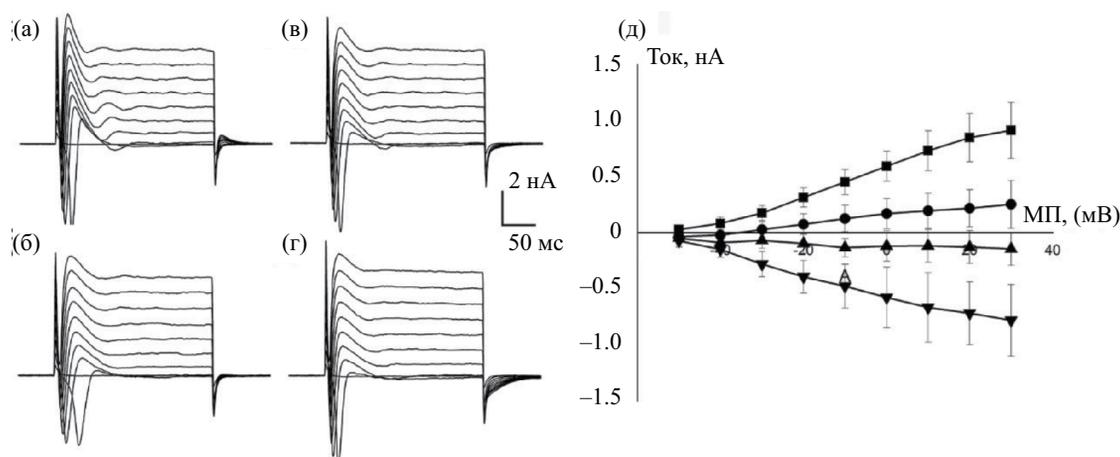
### *Внутрипипеточный раствор содержит калий*

В первой серии проведенных исследований, когда внутрипипеточный раствор (ВПР) содержал 120 мМ калия, а снаружи был стандартный физиологический раствор, содержащий 5 мМ калия, при подаче серии деполяризующих импульсов можно было наблюдать после входящих быстрых натриевых токов и выходящих калиевых токов выходящий ток небольшой амплитуды (рис. 1б, 2а-г). Величина этого тока обычно не превышала 100—300 пА при потенциале на мембране  $+30$  мВ. В предыдущих исследованиях нами было показано, что этот ток является кальций-активируемым хлорным током (КАХТ), который соответствует входу ионов хлора внутрь клетки (Вихарева и др., 2015, 2016). Уменьшение концентрации ионов наружного калия (далее —  $[K^+]_{нар.}$ ) до 0 мМ вело к увеличению (или к появлению, в случае отсутствия тока при 5 мМ KCl) КАХТ (рис. 2а). Увеличение концентрации наружного калия до 9—15 мМ вело к сдвигу потенциала реверсии этого тока в область ниже ( $-60$ ) мВ на мембране клетки. При  $[K^+]_{нар.} \sim 7$  мМ происходила полная реверсия направления хлорного тока, который становился «входящим». На графике видно, что амплитуда КАХТ значительно увеличивалась при увеличении концентрации калия до 9 мМ, а особенно она вырастала при увеличении концентрации калия до 15 мМ (рис. 2Г).

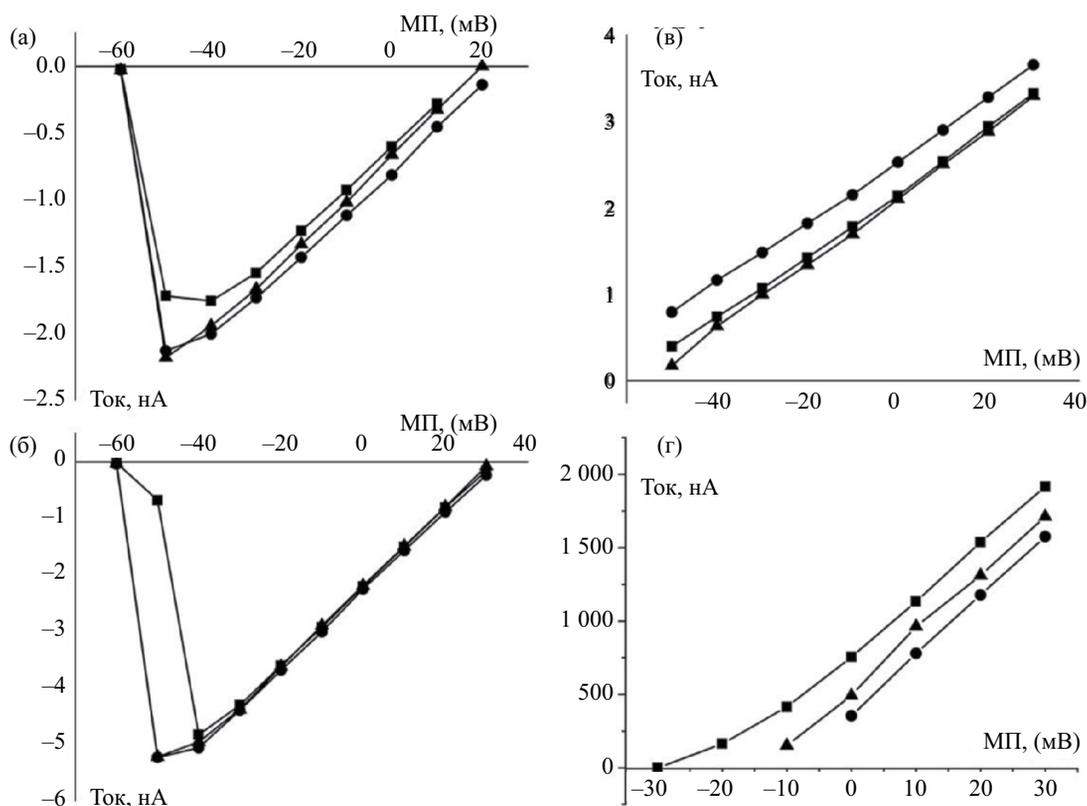
В этой же серии экспериментов, по исследованию влияния  $[K^+]_{нар.}$  на КАХТ, было показано, что изменение  $[K^+]_{нар.}$  не влияет на амплитуды входящих быстрых натриевых токов (рис. 3а) и на выходящие калиевые токи (рис. 3б). Изменение амплитуд как натриевых, так и калиевых токов не превышало 20 % от величин амплитуд этих токов в физиологическом растворе, содержащем 5 мМ калия. Причем не было различия, содержал ВПР калий или цезий (рис. 3). Некоторые результаты этих серий экспериментов были опубликованы ранее (Замойский и др., 2021).

### *Внутрипипеточный раствор содержит цезий*

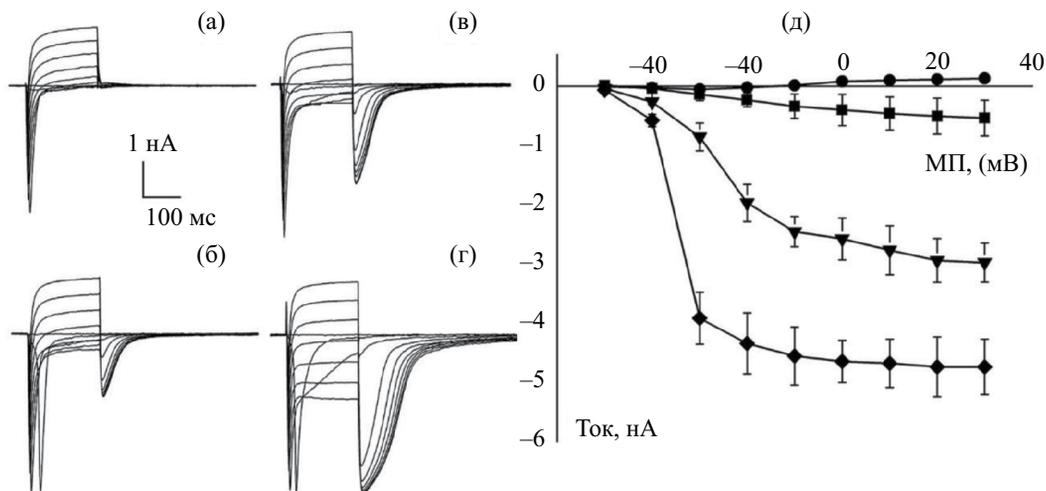
Во второй серии экспериментов использовали ВПР с цезием. Ранее мы показали, что замена ионов калия на ионы цезия в ВПР приводит к заметному увеличению КАХТ (Вихарева и др., 2016). В этом случае при подаче серии деполяризующих импульсов после завершения емкостного выброса в нормальном физиологическом растворе ( $[K^+]_{нар.} = 5$  мМ) можно было наблюдать «входящий» хлорный ток значительной амплитуды — порядка 500 пА при  $+30$  мВ на мембране. Снижение  $[K^+]_{нар.}$  приводило к уменьшению амплитуды этого тока, и при 0 мМ калия он исчезал совсем, или в некоторых нейронах появлялся очень маленький «выходящий» ток. Увеличение концентрации внешнего калия свыше 5 мМ приводило



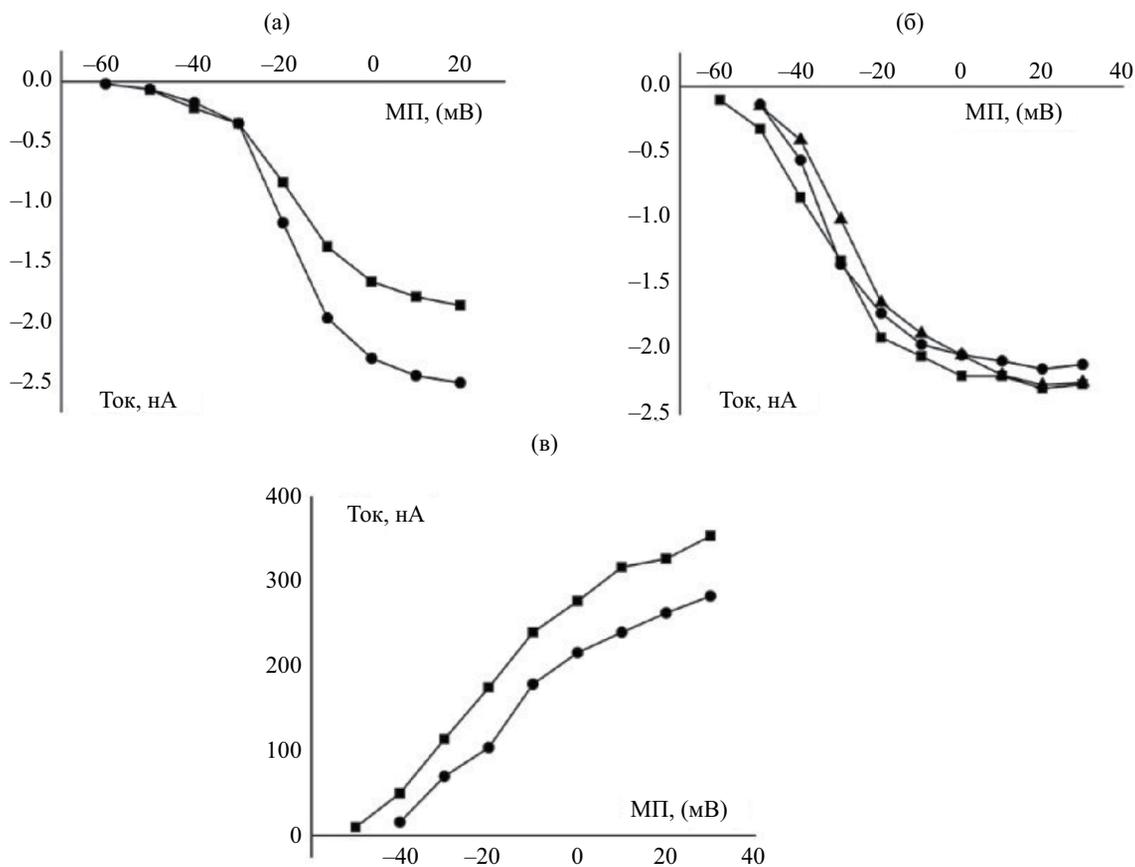
**Рис. 2.** Влияние различных концентраций калия в наружном растворе на амплитуду хлорных токов. Внутрипипеточный раствор содержит 120 мМ калия. Потенциал фиксации ( $-70$  мВ). а — интегральный ответ клетки в растворе с  $[K^+]_{нар.} = 0$  мМ ( $n=9$ ); б — ответ в растворе с  $[K^+]_{нар.} = 5$  мМ ( $n=20$ ); в — ответ в растворе с  $[K^+]_{нар.} = 9$  мМ ( $n=7$ ); г — ответ в растворе с  $[K^+]_{нар.} = 15$  мМ ( $n=4$ ); д — графики вольт-амперных характеристик, построенные для КАХТ при разных значениях  $[K^+]_{нар.}$ . По оси абсцисс — величина тока в наноамперах, по оси ординат — мембранный потенциал в милливольтях. Квадраты —  $[K^+]_{нар.} = 0$  мМ, круги —  $[K^+]_{нар.} = 5$  мМ, треугольники —  $[K^+]_{нар.} = 9$  мМ, перевернутые треугольники —  $[K^+]_{нар.} = 15$  мМ.



**Рис. 3.** Влияние различных концентраций калия во внешнем растворе на амплитуду входящих и выходящих токов в нейронах Пуркинье. а — график зависимости амплитуды быстрых натриевых токов от  $[K^+]_{нар.} = 0$  мМ (круги),  $[K^+]_{нар.} = 5$  мМ (квадраты) и  $[K^+]_{нар.} = 9$  мМ (треугольники). ВНП с калием; б — график зависимости амплитуды быстрых натриевых токов от  $[K^+]_{нар.} = 0$  мМ (круги),  $[K^+]_{нар.} = 5$  мМ (квадраты) и  $[K^+]_{нар.} = 9$  мМ (треугольники). ВНП с калием; в — график зависимости амплитуды максимального выходящего тока от  $[K^+]_{нар.} = 0$  мМ (круги),  $[K^+]_{нар.} = 5$  мМ (квадраты) и  $[K^+]_{нар.} = 9$  мМ (треугольники). ВНП с цезием; г — график зависимости амплитуды максимального выходящего тока от  $[K^+]_{нар.} = 0$  мМ (круги),  $[K^+]_{нар.} = 5$  мМ (квадраты) и  $[K^+]_{нар.} = 9$  мМ (треугольники). ВНП с цезием.



**Рис. 4.** Влияние различных концентраций калия во внешнем растворе на амплитуду хлорных токов; ВПР содержит 120 мМ цезия. а — токи от целой клетки при  $[K^+]_{нар.} = 0$  мМ; б — токи от целой клетки при  $[K^+]_{нар.} = 5$  мМ; в — токи от целой клетки при  $[K^+]_{нар.} = 9$  мМ; г — токи от целой клетки при  $[K^+]_{нар.} = 15$  мМ; д — график вольт-амперных характеристик КАХТ при  $[K^+]_{нар.} = 0$  мМ (круги); при  $[K^+]_{нар.} = 5$  мМ (квадраты); при  $[K^+]_{нар.} = 9$  мМ (треугольники); при  $[K^+]_{нар.} = 15$  мМ (ромбы).



**Рис. 5.** Влияние катионов наружного раствора на амплитуду КАХТ. а — влияние ионов натрия (черные квадраты — 140 мМ натрия снаружи, черные круги — 0 мМ натрия снаружи) ВПР с цезием; б — различная концентрация ионов магния (квадраты — 2 мМ, круги — 5 мМ, треугольники — 9 мМ) ВПР с цезием; в — наружный кальций (квадраты — 2 мМ, круги — 5 мМ) ВПР с калием.

к значительному росту амплитуды «входящего» хлорного тока (рис. 4 в-г). Вольт-амперные характеристики имели тенденцию к насыщению, при этом чем больше была концентрация наружного калия, тем быстрее КАХТ выходили на «плато» по своей амплитуде.

Таким образом, было показано, что амплитуда хлорного тока существенно зависит от концентрации калия снаружи мембраны и в случае заполнения электрода ВПР с цезием. Причем зависимость величины токов от концентрации наружного калия для ВПР с цезием оказалась более сильной, чем для случаев, где ВПР содержал калий. Максимальные амплитуды хлорных токов были для ВПР с цезием ( $-4.6 \pm 0.55$  нА,  $n = 23$ ) и для ВПР с калием ( $-0.75 \pm 0.3$  нА,  $n = 31$ ) для раствора с  $[K^+]_{нар.} = 15$  мМ при  $+30$  мВ на мембране.

#### Влияние концентраций других наружных катионов на КАХТ

Были поставлены эксперименты по выяснению степени влияния других катионов наружного физиологического раствора:  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ . Так, при полной замене NaCl на трис-Cl наблюдали некоторое увеличение амплитуды КАХТ (рис. 5а).

Этот эффект проявлялся для всех концентраций наружного калия, однако, учитывая тот факт, что концентрация натрия менялась радикальным образом (практически — на 2,5 порядка): от 140 мМ до 0, — эффект увеличения КАХТ был значительно меньше, чем при изменении  $[K^+]_{нар.}$  от 0 до 15 мМ. При изменении наружной концентрации ионов магния от 2 до 9 мМ амплитуда КАХТ оставалась неизменной, что видно на рис. 5б. Увеличение концентрации ионов кальция с наружной стороны с 2 до 5 мМ приводило к 20–25% уменьшению амплитуды КАХТ во всем диапазоне мембранных потенциалов (рис. 5в).

#### Замена ионов калия на ионы цезия с наружной стороны мембраны

Ионы цезия, имеющие больший радиус в водном растворе, чем ионы калия, используются в электрофизиологии как эффективный блокатор калиевых каналов с внутренней стороны мембраны клетки. Чтобы убедиться в уникальности влияния ионов наружного калия на амплитуду КАХТ, провели эксперименты, в которых ионы калия были заменены на эквимоллярные концентрации ионов цезия с наружной стороны мембраны. Результат такого эксперимента представлен на рис. 6, на котором видно, что изменение концентрации наружного цезия не влияет на амплитуду КАХТ.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные исследования показали, что изменения в концентрации наружного калия приводят к существенному изменению амплитуды хлорных токов в нейронах головного мозга млекопитающих. Установлено, что наряду с необходимостью внутриклеточного кальция для активации хлорных токов огромную роль в их регуляции играют ионы внешнего калия. Это влияние ионов калия на КАХТ показано нами не впервые — ранее такое влияние калия было продемонстрировано для КАХТ нейронов моллюска (Гелетюк, Казаченко, 1983). Таким образом, этот механизм остается эволюционно неизменным для животных разных типов.

Установлены различия во влиянии калия на токи КАХК в зависимости от того, содержит ВПР калий или цезий. Например, на рис. 1б отчетливо видно, что с изменением концентрации наружного калия меняется не только вольт-амперная характеристика хлорного тока, но и потенциал реверсии этих токов. Так, если при 5 мМ ионов калия потенциал реверсии

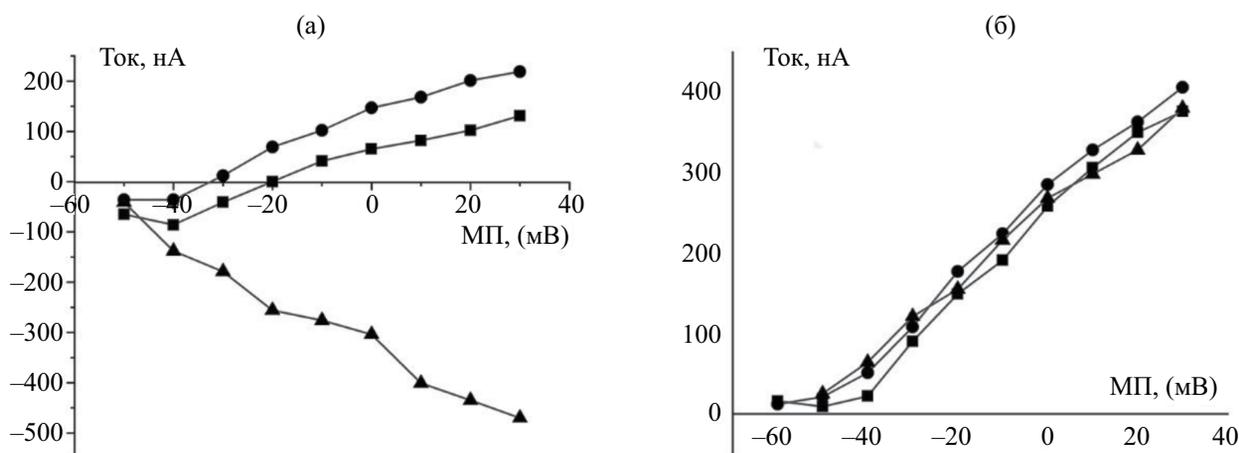
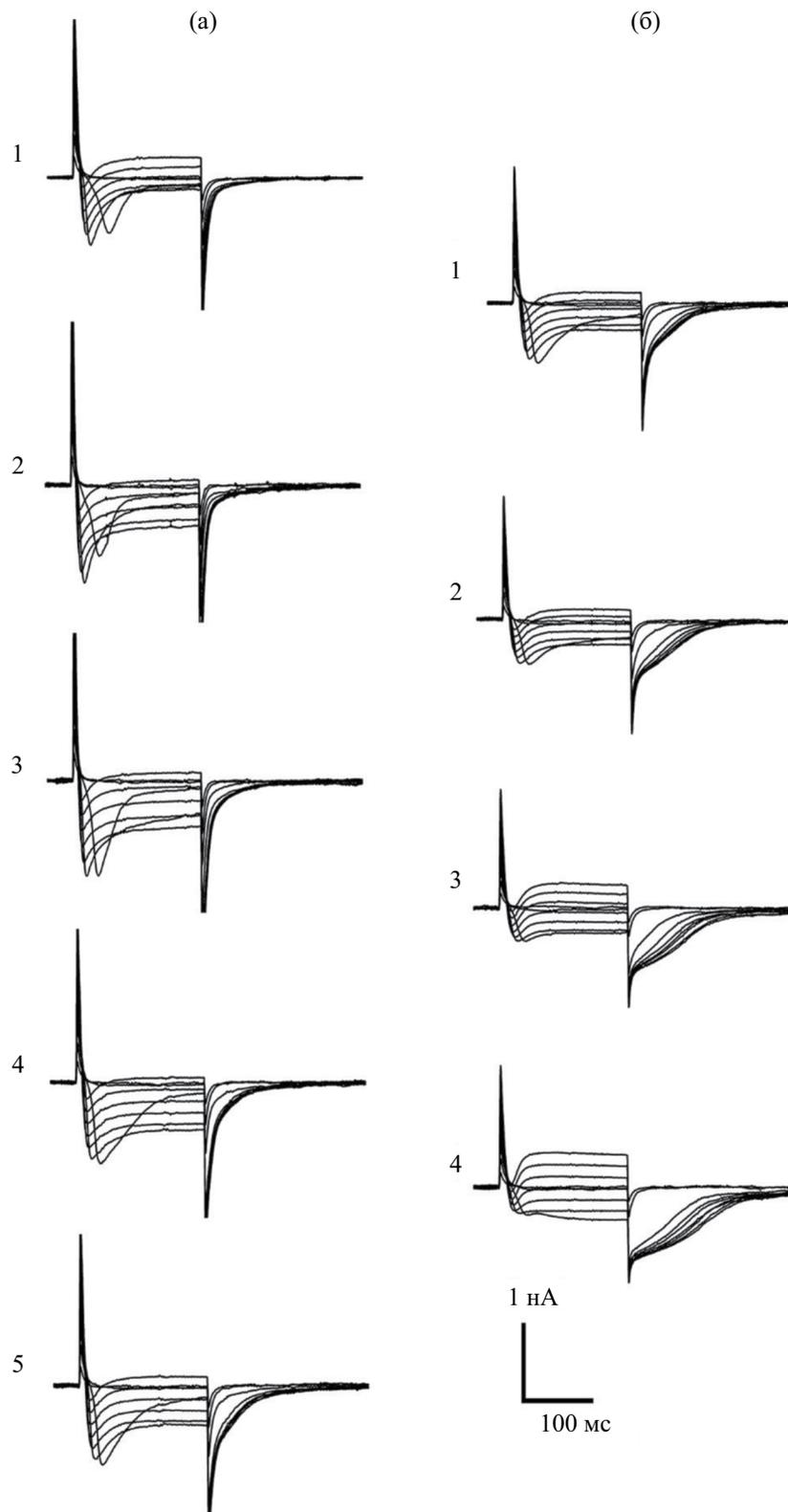


Рис. 6. Амплитуды КАХТ. а — при различных концентрациях ионов калия с наружной стороны (круги —  $[K^+]_{нар.} = 0$  мМ, квадраты —  $[K^+]_{нар.} = 5$  мМ, треугольники —  $[K^+]_{нар.} = 15$  мМ); б — при различных концентрациях ионов цезия с наружной стороны (круги —  $[Cs^+]_{нар.} = 5$  мМ, квадраты —  $[Cs^+]_{нар.} = 9$  мМ, треугольники —  $[Cs^+]_{нар.} = 15$  мМ).



**Рис. 7.** Действие низких (а) и высоких (б) концентраций ионов калия с наружной стороны мембраны одной клетки. А1 —  $[K^+]_{нар.} = 0$  мМ, А2 —  $[K^+]_{нар.} = 1$  мМ, А3 —  $[K^+]_{нар.} = 2$  мМ, А4 —  $[K^+]_{нар.} = 3$  мМ, А5 —  $[K^+]_{нар.} = 5$  мМ; Б1 —  $[K^+]_{нар.} = 5$  мМ, Б2 —  $[K^+]_{нар.} = 9$  мМ, Б3 —  $[K^+]_{нар.} = 15$  мМ, Б4 —  $[K^+]_{нар.} = 24$  мМ.

КАХК составляет (–25) мВ, то при более высоких концентрациях калия (9 мМ и 15 мМ) потенциал реверсии смещается в область мембранного потенциала ниже (–50) мВ. Подобное смещение не может быть объяснено в рамках уравнения Нернста для ионного канала, поскольку изменение концентрации хлора составляет +4 (при 9 мМ) или +13 мМ (при 15 мМ) при общей концентрации ионов хлора с обеих сторон мембраны порядка 153 мМ.

Полученные результаты свидетельствуют об избирательном влиянии некоторых экстраклеточных катионов и анионов на другие ионные каналы. Известным фактом является четкая зависимость активации целого ряда каналов — калиевых, хлорных и других — от концентрации внутриклеточного кальция — Брежестовский с соавт. (Bregestovski *et al.*, 1988; Григорьев, 2021). О влиянии каких-либо экстраклеточных ионов на каналы, проводящие отличные от них ионы, известно крайне мало. Нами показана зависимость быстрых натриевых токов в нейронах Пуркинье от концентрации наружного хлора (Замойский, Григорьев, 2017). Изложенные в данной статье и ранее (Замойский и др., 2021) результаты позволяют говорить о том, что наряду с внутриклеточной регуляцией кальцием в нейронах имеется значительное влияние ряда ключевых ионов — калия, хлора — на функционирование соседних каналов (и проводимых ими токов), осуществляемое ими с наружной стороны мембраны, т. е. концентрациями этих ионов в межклеточном матриксе и физиологических жидкостях (спинномозговой, эндолимфе уха и др.). Следует отметить, что это воздействие на другие ионные каналы является весьма избирательным. Например, в данной работе калий влиял на хлорные токи (каналы), но практически не влиял на быстрые натриевые токи и в гораздо меньшей степени влиял на собственно калиевые каналы (токи). В то же время нами показано, что анионы хлора радикально влияли на быстрые натриевые токи, но очень мало влияли на калиевые каналы (токи).

Полученные результаты позволяют также по-новому взглянуть на патологические процессы, имеющие место при гипо- и гиперкалиемии. Хотя мы не имеем прямых данных, указывающих на участие КАХК в этих патологических процессах, полученные данные о высокой чувствительности хлорных токов к изменению концентрации межклеточного калия позволяют сделать предположение, что изменение их амплитуды вносит свой вклад в эти процессы. Особенно это заметно при низких концентрациях калия (рис. 7). Гипокалиемия (уровень калия ниже 3.5 мМ в крови) приводит к ряду тяжелых патологических состояний, ряд из которых может быть напрямую ассоциирован с уменьшением активности КАХК. Это снижение активности перистальтики желудочно-кишечного тракта с последующими запорами, вплоть до динамической кишечной непроходимости — Гуо с соавт. (Guo *et al.*, 2017), замедление рефлексов

и умственных процессов — Хуанг с соавт. (Huang *et al.*, 2012); патология мочеиспускания — Ю с соавт. (Yu *et al.*, 2015). Во всех этих случаях КАХК играют важную роль. Не всегда имеется возможность естественным путем (через питание) повысить содержание калия в крови или спинномозговой жидкости: этому могут препятствовать различные патологии метаболизма. В этих случаях прием активаторов или потенциаторов КАХК может снять патологии, связанные с низкой активностью КАХК.

В случае гиперкалиемии, которая характеризуется аритмией, ослаблением скелетной мускулатуры вплоть до паралича, неустойчивостью артериального давления, мы можем заключить, что некоторые из этих симптомов могут быть связаны с КАХК — например, неустойчивость артериального давления, поскольку известно, что КАХК играют важную роль в регуляции кровяного давления — Ванг с соавт. (Wang *et al.*, 2015). В этом случае прием блокаторов КАХК может существенно снизить патологические проявления гиперкалиемии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного электрофизиологического исследования были сделаны следующие выводы:

Амплитуда токов кальций-активируемых хлорных каналов (КАХК) существенно зависит от концентрации внешнего калия.

В случае, когда внутривиточный раствор содержит вместо калия цезий, изменение амплитуды токов КАХК под действием внешнего калия выражено гораздо сильнее.

Амплитуда быстрых натриевых токов и выходящих калиевых токов гораздо менее чувствительна к изменению концентрации ионов внешнего калия по сравнению с токами КАХК.

Высокая чувствительность токов КАХК к изменению концентрации межклеточного калия позволяет сделать предположение, что КАХК вносят существенный вклад в патофизиологию гипо- и гиперкалиемии.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИФАВ РАН № FFSN-2021-0005 (2021—2023).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с экспериментальными животными выполнены в соответствии с требованиями, касающимися гуманного обращения с животными, и стандартными операционными процедурами Центра доклинических исследований Сеченовского Университета. Проведение экспериментов с животными

одобрено Комиссией по биомедицинской этике ИФАВ РАН (Протокол № 1018 от 16.05.2018).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Вихарева Е.А., Замойский В.Л., Григорьев В.В., Бачурин С.О.* Кальций-активируемые хлорные токи в мембране клеток Пуркинье мозжечка крыс // ДАН. 2015. Т. 465, С. 372—374. DOI: 10.7868/S0869565215330282.
- Вихарева Е.А., Замойский В.Л., Григорьев В.В.* Модификация кальций-зависимых хлорных токов в нейронах Пуркинье мозжечка крыс // БЭБМ. 2016. Т. 162, С. 672—677. DOI: 10.1007/s10517-017-3694-1.
- Гелетюк В.И., Казаченко В.Н.* Одиночный калий-зависимый Cl-канал в нейронах моллюска: множественность состояний проводимости. // ДАН. 1983. Т. 268. № 5. С. 1245—1247.
- Григорьев В.В.* Кальций-активируемые хлорные каналы: структура, свойства, роль в физиологических и патологических процессах // Биомедицинская химия. 2021. Т. 67. № 1. С. 17—33. DOI: 10.18097/PBMS20216701017.
- Замойский В.Л., Григорьев В.В.* Ключевая роль ионов хлора в регуляции быстрых натриевых токов в нейронах крыс // ДАН. 2017. Т. 477. № 4. С. 493—495. DOI: 10.7868/S0869565217340229
- Замойский В.Л., Бовина Е.А., Бачурин С.О., Григорьев В.В.* Роль ионов калия в регуляции кальций-активируемых хлорных каналов. ДАН. 2021. Т. 500. С. 470—473. DOI: 10.31857/S2686738921050334.
- Bregestovski P.D., Printseva O.Y., Serebryakov V., Stinakre J., Turmin A., Zamoyski V.* Comparison of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in the membrane of smooth muscle cells isolated from adult and foetal human aorta // *Pflugers Archiv*. 1988. V. 413. P. 8—13.
- Crottès D., Jan L.Y.* The multifaceted role of TMEM16A in cancer // *Cell Calcium*. 2019. V. 82:102050. DOI: 10.1016/j.ceca.2019.06.004.
- Guo S., Chen Y., Pang C., Wang X., Qi J., Mo L., Zhang H., An H., Zhan Y.* Ginsenoside Rb1, a novel activator of the TMEM16A chloride channel, augments the contraction of guinea pig ileum // *Pflugers Archiv*. 2017. V. 469. P. 681—692. DOI:10.1007/s00424-017-1934-x.
- Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J.* Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches // *Pflugers Arch*. 1981. V. 391, P. 85—100. DOI:10.1007/BF00656997.
- Huang W.C., Xiao S., Huang F., Harfe B.D., Jan Y.N., Jan L.Y.* Calcium-activated chloride channels (CaCCs) regulate action potential and synaptic response in hippocampal neurons // *Neuron*. 2012. V. 12. № 74(1). P. 179—192. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.01.033.
- Ji Q., Guo S., Wang X., Pang C., Zhan Y., Chen Y., An H.* Recent advances in MEM16A: Structure, function, and disease // *J Cell Physiol*. 2019. V. 234. P. 7856—7873. DOI: 10.1002/jcp.27865.
- Kamaleddin M.A.* Molecular, biophysical, and pharmacological properties of calcium-activated chloride channels // *J. Cell Physiol.*, 2018. V. 233. P. 787—798. DOI: 10.1002/jcp.25823.
- Kaneda M., Nakamura H., Akaike N.* Mechanical and enzymatic isolation of mammalian CNS neurons // *Neurosci. Res*. 1988. V. 5. P. 299—315. DOI: 10.1016/0168-0102(88)90032-6.
- Kunzelmann K., Tian Y., Martins J.R., Faria D., Kongsuphol P., Ousingsawat J., Thevenod F., Roussa E., Rock J., Schreiber R.* Anoctamins // *Pflugers Arch*. 2011. V. 462. P. 195—208. DOI: 10.1007/s00424-011-0975-9.
- Wang B., Li C., Huai R., Qu Z.* Overexpression of ANO1/TMEM16A, an arterial Ca<sup>2+</sup>-activated Cl-channel, contributes to spontaneous hypertension // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015. V. 82. C.22—32. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.02.020.
- Yu K., Whitlock J.M., Lee K., Ortlund E.A., Cui Y.Y., Hartzell H.C.* Identification of a lipid scrambling domain in ANO6/TMEM16F // *Elife*. 2015. 4: e06901. DOI: 10.7554/eLife.06901.

## Calcium-activated chloride channels. Role of potassium ions

© 2024 V. L. Zamoyski\*, #, A. V. Gabrelian\*, V. V. Grigoriev\*

*\*Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Sciences,  
Chernogolovka, Severnyi Pr. 1, Moscow Region, 142432 Russia.*

*#E-mail: v zam@yandex.ru*

Using the patch-clamp method in the whole-cell configuration, it was shown that external potassium ions play an important role in the regulation of calcium-activated chloride currents. A clear dependence of the amplitude of chloride currents on changes in the concentration of external potassium is shown. Changes in concentration of sodium, magnesium and calcium ions from membrane outside have no so significant effect, like outside potassium ions. The effect of potassium on the amplitudes of chloride currents is significantly greater than the effect it has on other cell ionic currents — sodium, potassium, cation. There is reason to believe that a change in the amplitudes of chloride currents contributes to the pathophysiological processes characteristic of hypokalemia and hyperkalemia.

*Key words:* patch-clamp method, Purkinje cells of the cerebellum, calcium-activated chloride channels (CaCC), potassium ions.

УДК 581.526.3 (571.54/.55)

## ФЛОРА И РАСТИТЕЛЬНОСТЬ ОЗЕРА АРБАКАЛИР И ИСТОЧНИКА ЧАРСКИЙ ГОРЯЧИЙ КЛЮЧ (ЧАРСКАЯ КОТЛОВИНА, ЗАБАЙКАЛЬЕ)

© 2024 г. Б. Б. Базарова\*, @, А. П. Куклин\*, Т. В. Желибо\*, Л. В. Замана\*

\*Институт природных ресурсов, экологии и криологии СО РАН, ул. Недорезова, 16а, Чита, 672014 Россия

@E-mail: bazarovabb@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.03.2023

После доработки 10.05.2023

Принята к публикации 10.05.2023

В результате комплексного экологического исследования оз. Арбакалир и источника Чарский горячий ключ в вегетационный период 2021 года изучены физико-химические показатели воды, видовое и фитоценологическое разнообразие растительности. Во флоре водоемов выявлено 56 таксонов из 7 отделов, из них 22 вида относятся к макроводорослям, по одному представителю мохообразных, хвощевидных и плауновидных, 31 вид цветковых растений. Два вида включены в Красную книгу как на федеральном, так и на региональном уровне. Два вида относятся к реликтовым. В структуре флоры присутствуют представители трех экотипов, из которых 38 видов (67.9%) относятся к настоящим водным растениям. В синтаксономической структуре водной и прибрежно-водной растительности выделено 18 ассоциаций из 12 формаций. На основе факторного анализа установлено, что ведущими факторами, влияющими на распределение фитоценозов, являются температура воды, водородный показатель, минерализация, концентрация основных катионов, анионов и биогенных элементов.

*Ключевые слова:* *Isoetes echinospora*, *Caulinia flexilis*, реликтовые виды, цианобактериальные маты, факторный анализ.

DOI: 10.31857/S1026347024030094, EDN: VAIDMW

Интенсификация промышленного производства на севере Забайкальского края ведет к усилению воздействия в том числе и на водоемы, крайне слабо изученных в гидробиологическом отношении, что в условиях современных климатических изменений может привести к необратимым последствиям и потере уникальных местообитаний. Основные исследования в Чарской котловине были связаны с периодом проектирования и строительства Байкало-Амурской магистрали (БАМ, 2014). При этом работ, рассматривающих биоту водоемов Чарской котловины, очень мало, и практически нет работ о растительности озер данного региона. Среди значительного количества водоемов в Чарской котловине особо выделяются ледниково-моренное оз. Арбакалир и расположенный в 135 м от юго-западного берега озера термальный источник Чарский горячий ключ. Источник является «диким» народным курортом с нерегламентированным использованием термальной воды. Эти два водных объекта имеют статус комплексного памятника природы регионального значения (Решения Читинского облисполкома № 28 от 14.01.1980 и № 593 от 14.06.1983).

Озеро Арбакалир и термальный источник тесно связаны между собой и составляют единую экосистему, обладающую уникальным составом водной флоры и растительности, содержащую виды, включенные в Красную книгу РФ и Забайкальского края.

Цель работы — выявить состав и структуру растительности оз. Арбакалир и факторы, их определяющие. Полученные результаты внесут вклад в раскрытие причинно-следственных взаимосвязей растительности озера и параметров среды, послужат основой для дальнейших мониторинговых наблюдений исследованных охраняемых объектов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования оз. Арбакалир и источника Чарский горячий ключ (рис. 1) были проведены в период открытой воды, в августе 2021 г., сотрудниками Института природных ресурсов, экологии и криологии СО РАН. Выполнены батиметрические, гидрохимические, гидробиологические работы.

Гидробиологические исследования проведены согласно общепринятым методикам (Катанская, 1981). Изучение растительности проведено путем детально-маршрутного обследования с подробным описанием фитоценозов и определением глубины и характера грунта. Для подъема растений из водоема использовали якорь-кошку с металлической сеткой. Собрано 50 гербарных листов. Комплексные гидробиологические и гидрохимические исследования проведены на 6 станциях, расположенных в разных секторах. В ходе

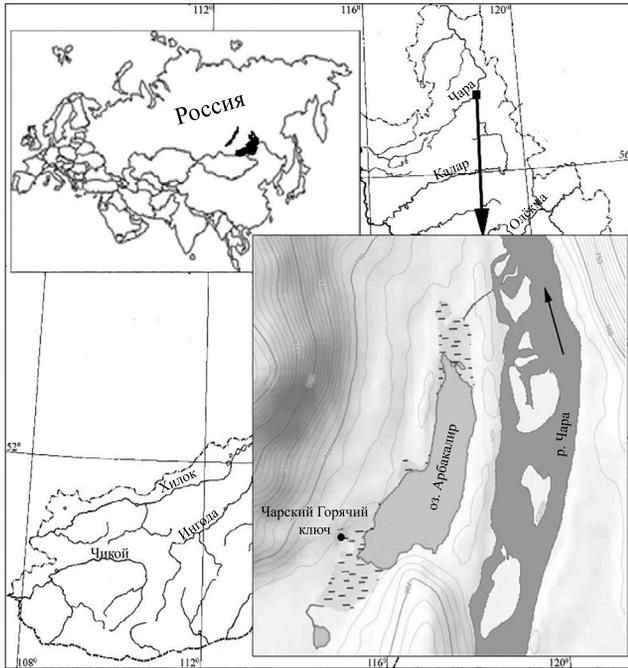


Рис. 1. Местоположение оз. Арбакалир с источником Чарский горячий ключ.

маршрутных наблюдений выполнено 84 описания. Крупные сообщества описывались на учетных площадках размером 100 м<sup>2</sup>, меньшие — в пределах их границ. Для расчета площади водных фитоценозов в ArcGIS составлены картосхема распространения видов и картосхема растительных сообществ. Общая площадь фитоценоза рассчитана как сумма площадей видов, занимаемых ими в водоеме (Катанская, 1981):

$$S_3 = \sum S_{\text{мм}} \cdot \text{ПП}, \text{ м}^2,$$

где S<sub>3</sub> — площадь зарослей на водном объекте, S<sub>мм</sub> — площадь сообщества, в состав которого входит конкретный вид, на картосхеме, ПП — проективное покрытие конкретного вида, входящего в данное сообщество.

Степень зарастания (Пс) водного объекта рассчитана как отношение площадь зарослей на водоеме к площади акватории озера.

Определение таксономической принадлежности цианобактерий на основании морфологических признаков проводили по М. М. Голлербаху с соавторами (1953) и по J. Komárek (2013). Для определения макроскопических водорослей использованы определители зигнемовых (Рундина, 1998), эдогониевых (Юнгер, Мошкова, 1993) и харовых (Голлербах, Красавина, 1983) водорослей. Определение видов осуществлялось с помощью микроскопов “Альтами” и “Биолам”. Таксономическая принадлежность сосудистых растений определена по “Флоре Сибири” (1988, 1993, 1997), мхов — по руководству “Мхи Среднего Урала” (Дьяченко, 1996). Номенклатура водорослей приведена по AlgaeBase (Guiry, Guiry, 2022). Образцы хранятся в гербарии ИПРЭК СО

РАН, отдельные дублеты — в гербарии Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН (LE).

При классификации макроводорослей по способу прикрепления использована классификация J. D. Allan и M. M. Castillo (2007) с учетом положений, предложенных В. J. Biggs и С. W. Hickey (1994). Экологическая структура флоры дана по (Папченков, 2001). Выделение растительных ассоциаций проведено на основе доминантно-детерминантного подхода.

Математическая обработка полученных данных проводилась с использованием надстройки ExcelStat к пакету программ Microsoft Excel 2010. Для изучения взаимосвязей биоразнообразия макрофитов и характеристик среды применяли факторный анализ методом главных компонент (РСА).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На основе измерений глубин оз. Арбакалир установлено, что современные очертания озера сохраняют черты русла р. Чара с характерным чередованием мелководных частей (в южной и юго-западной части от 20 до 40 см, в северной части водоема — от 30 до 45 см) и более глубокой в центре водоема (65—70 см) (рис. 2). Площадь общего водного объекта (оз. Арбакалир и источник Чарский горячий ключ) составляет 346 810 м<sup>2</sup>. Температура поверхностного слоя воды в исследованных водных объектах колеблется от +16 до +40 °С. Наиболее высокие температуры зарегистрированы в местах выходов термальных вод, которые, поступая в озеро, охлаждаются до +22 °С. В местах впадения питающих озеро ручьев температура воды снижалась до +16 °С. У западного побережья температура воды выше, чем на большей части акватории. Это может свидетельствовать о субаквальной разгрузке термальных вод.

По химическому составу термальная вода источника Чарский горячий ключ хлоридно-сульфатная натриевая и относится к олекминскому типу — по названию источника на территории р. Олёкмы, где имеются источники такого анионного состава (Ломоносов и др., 1977). Озерная вода по составу анионов трехкомпонентная — хлоридно-гидрокарбонатно-сульфатная кальциево-натриевая (табл. 1). Вода впадающего в озеро ручья — гидрокарбонатная натриево-кальциевая. Преобладание сульфата и натрия в озерной воде определяется участием в водном питании озера термальных вод.

Всего во флоре оз. Арбакалир и источника Чарский горячий ключ выявлено 56 таксонов из 31 семейств, 36 родов, относящихся к 7 отделам. При этом Cyanobacteria представлены 11 видами, Chlorophyta — 3, Charophyta — 8, Lycoperidophyta, Equisetophyta, Bryophyta представлены по одному виду. Цветковые растения представлены 31 видами, из 18 семейств, 20 родов. Наибольшим разнообразием характеризуются семейства Surireaceae, Potamogetonaceae, по 2 вида в семействах Agaceae, Juncaceae, остальные представлены по 1 виду.

Флора источника Чарский горячий ключ включает 24 таксона. Здесь наибольшего разнообразия

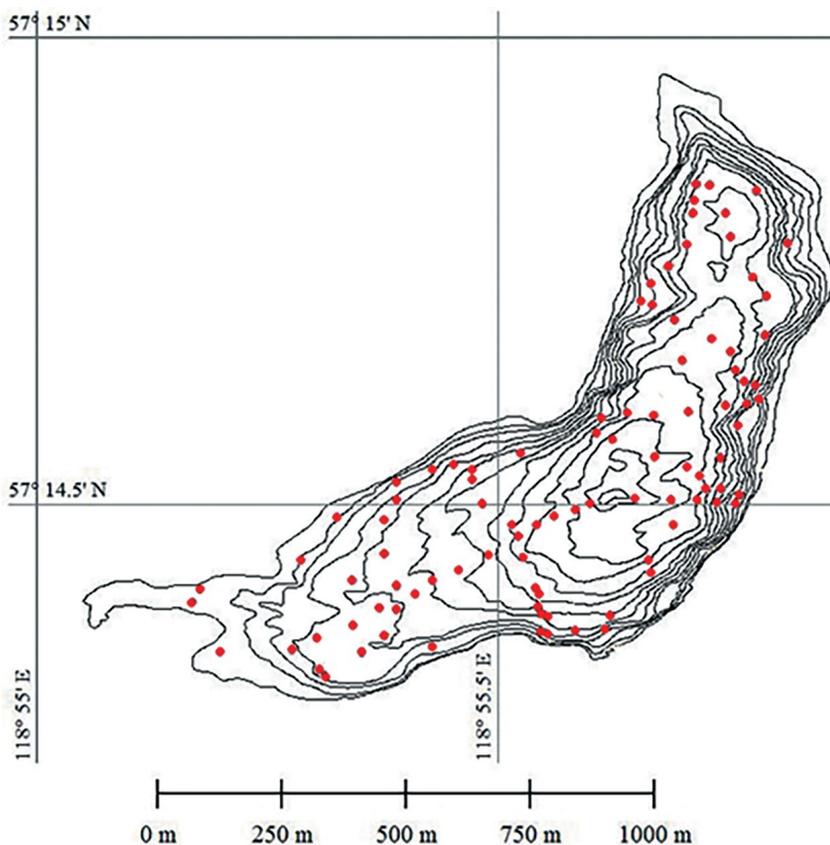


Рис. 2. Батиметрическая карта оз. Арбакалик (изобаты приведены через 5 см) с точками описания растительности.

Таблица 1. Химический состав вод оз. Арбакалик и источника Чарский горячий ключ

Показатель	Север	Центр	Юг	Источник 1	Источник 2	Ручей
pH	6.42	6.46	6.72	9.38	9.3	6.4
TDS, мг/л (М)	120.2	114.50	142.9	435.8	453.2	33.4
$\text{HCO}_3^-$	25.9	28.40	36.9	12.4	19.8	20.5
$\text{CO}_3^{2-}$				18.1	14.3	0
$\text{SO}_4^{2-}$	37.2	28.70	39.3	175.8	184.7	0.97
$\text{Cl}^-$	14.8	13.50	17.7	67.7	69	1.04
$\text{F}^-$	1.81	1.90	2.44	8.81	8.74	0.19
$\text{Ca}^{2+}$	8	7.92	9.3	9.23	9.2	5.77
$\text{Mg}^{2+}$	0.9	0.91	0.77	0.25	0.05	0.96
$\text{Na}^+$	30	31.80	35	141.4	145.2	3.3
$\text{K}^+$	0.56	0.71	0.65	1.83	1.91	0.26
Si	1.68	1.59	5.69	26.6	25.6	4.25
$\text{NH}_4^+$	0.91	0.34	0.56	0.1	0.1	0.27
$\text{NO}_2$	0.03	0.23	0.01	0.003	0.01	0.003
$\text{NO}_3^-$	0.24	0.21	0.29	0.15	0.2	0.12
$\text{P}_{\text{общ}}$	0.04	0.05	0.06	0.12	0.12	0.04

и развития достигли 2 отдела: Cyanobacteria и Charophyta. При этом, если Cyanobacteria формируют значимые цианобактериальные маты в термальных участках, роль харофитов возрастает в областях остывания термальных вод в устьях ручьев.

Во флоре оз. Арбакалир выявлено 38 таксонов. В отличие от источника, в озере развитие цианобактерий ограничено 3 видами. *Nostoc linckia* Born. ex Born. & Flah., формирующий в западной части водоема колонии диаметром до 5 см, является достаточно редким видом в водоемах Забайкальского края (Kuklin, unpubl. data). Эпифит *Tolypothrix tenuis* Kütz. ex Born. & Flah. изредка встречается на *Potamogeton compressus* L. в южной части водоема. Субстратом для развития *Gloeotrichia pisum* Thur. ex Born. & Flah. служат *Chara strigosa* A. Braun, мох *Drepanocladus aduncus* Warnstorff и рдесты на глубинах от 0.3 до 0.6 м. На отдельных растениях колонии *G. pisum* сливаются, образуя слизистый чехол.

Chlorophyta представлены 3 видами, эпифитно развивающимися на *Sagittaria natans* Pall. и *Sparganium emersum* Rehmann.

Среди Charophyta наибольшего развития в озере получил ледниковый реликтовый вид *Ch. strigosa*. Другим часто встречающимся представителем отдела Charophyta является *Mougeotia* sp., образующая куполообразные скопления в северной части водоема в окнах между зарослями *S. natans* и *Sp. emersum*. *Nitella* sp. встречается небольшими скоплениями в южной части озера.

Отделы Equisetophyta, Bryophyta и Lycopodiophyta представлены по 1 виду. Отдел Lycopodiophyta представлен *Isoetes echinospora* Durieu — реликтовым видом, включенным в Красную книгу Российской Федерации (Красная ..., 2021). Цветковые растения представлены 31 видами, 19 семействами, 19 родами. Наибольшим разнообразием характеризуются семейства Сурегасеае и Potamogetonaceae, остальные семейства представлены по 1 виду. Среди цветковых растений выявлен реликтовый вид *Caulinia flexilis* Willd, включенный в Красную книгу РФ (Красная ..., 2021) и региональную Красную книгу Забайкальского края (Красная ..., 2017).

По способу прикрепления макрофитные водоросли озера Арбакалир представлены 2 видами метафитона, 5 видами эпифитона. В экологической структуре флоры исследованных объектов выявлено 3 экотипа. Среди настоящих водных растений (экотип гидрофиты) обнаружено 38 видов. В его составе выделено 4 экологических группы: макроводоросли и водные мхи — 23 вида; погруженные укореняющиеся гидрофиты — 8 видов; укореняющиеся гидрофиты с плавающими в воде листьями — 5 видов; гидрофиты, свободно плавающие на поверхности воды, — 2 вида. Прибрежно-водные растения представлены 2 экотипами: высокотравные гелофиты — 2 вида, гидрофиты и гигромезофиты — 16 видов.

*Синтаксономический состав растительности.* В оз. Арбакалир и источнике Чарский горячий ключ выделено 12 формаций, 18 ассоциаций (табл. 2, рис. 3)).

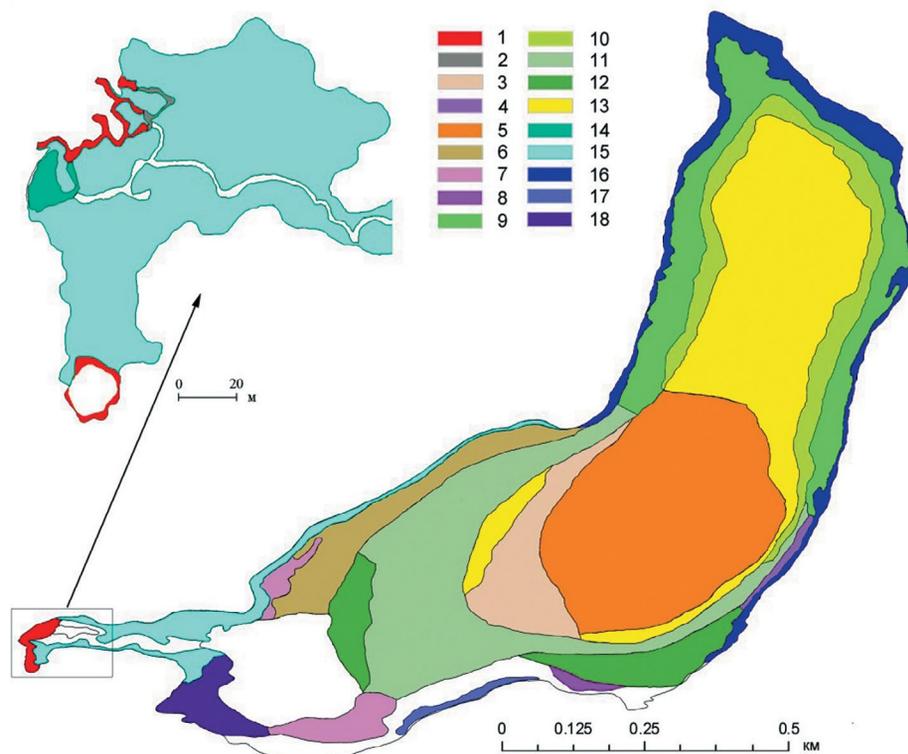


Рис. 3. Карта растительного покрова оз. Арбакалир и источника Чарский горячий ключ. Нумерация фитоценозов соответствует тексту.

**Таблица 2.** Синтаксономическая структура растительности исследованных водных объектов и доля их сообществ в зарастании

Класс формаций	Формации	Ассоциации
Гидрофиты	Группа формаций Макрофитные водоросли	
	1 Cyanophyteta	1 Cyanophytetum
	Группа формаций Погруженные укореняющиеся гидрофиты	
	2 Chareta	2 Charetum sp
		3 Charetum strigose
	3 Caulinieta	4 Caulinietum flexilis
	4 Potamogetoneta	5 Potamogetonetum perfoliatus
		6 Potamogetonetum berchtoldii
	5 Myriophyllumeta sibiricum	7 Myriophyllumetum sibiricum
	6 Callitricheta hermaphroditica	8 Callitrichetum hermaphroditica
	Группа формаций Погруженные укореняющиеся гидрофиты с плавающими на поверхности воды листьями	
	7 Sagittarieta natans	9 Sagittarietum natans
		10 Sagittaria–Isotesetum echinospora
		11 Sagittaria–Sparganiumetum emersum
12 Sagittaria Herbae		
8 Sparganiumeta emersum	13 Sparganiumetum emersum	
Группа формаций Гидрофиты, свободно плавающие на поверхности воды		
9 Lemneta trisulca	14 Lemnetum trisulca	
Гелофиты	Группа формаций Прибрежно-водные и воздушно-водные растения	
	10 Scrispeta tabernaemontani	15 Scrispetum tabernaemontani
	11 Carexeta	16 Carexetum nigra
		17 Carexetum aquatilis
12 Hippuriseta vulgaris	18 Hippurisetum vulgaris	

Настоящая водная растительность представлена 9 формациями и 14 ассоциациями. В гелофитной растительности выделено 3 формации 4 ассоциаций. Ниже приведен перечень выделенных сообществ с их краткой характеристикой. Зарастаемость озера составляет 88 % от его площади.

Сообщества сине-зеленых водорослей, или цианобактерии, широко распространены в различных континентальных водных объектах, однако классификации их фитоценозов в отечественной литературе уделяют мало внимания (Папченко, 2001). В некоторых случаях образуемые ими сообщества выделяют в «проценозы» — временные нестабильные группировки макрофитов, способные к быстрому и массовому развитию в течение некоторой части вегетационного сезона (Свириденко и др., 2012). В источнике Чарский горячий ключ сине-зеленые водоросли образуют стабильные фитоценозы.

1. Cyanophyteta создают основной фон растительности в горячих выходах источника Чарский горячий ключ, образуя цианобактериальные маты на площади 10 м<sup>2</sup>. На участках с температурой воды

40—50 °С на песчано-каменистых грунтах плотные скопления формирует *Leptolyngbya gelatinosa* (W.) An. & Kom., образуя моноспецифические фитоценозы слоем 3—7 мм на глубине 2—40 см. На участках источников, где отдыхающие принимают ванны, развитие *L. gelatinosa* ограничено узкой кромкой у берегов. В разливах с температурой от 12 до 20 °С и образуемых ими ручейках встречаются группировки из *Phormidium retzii* Kütz. ex Gom. и *Oscillatoria princeps* Vauch. ex Gom.

2. Charetum sp. доминант *Chara* sp., число видов 2; над *Chara* sp. *L. gelatinosa* формирует желеобразные скопления; проективное покрытие до 90 %; сообщество расположено в термальном ручье на глубине 35—40 см; грунт илистый; площадь 40 м<sup>2</sup>. По мере оттока горячей воды и ее охлаждения до +20...+25 °С появляются виды рода *Spirogyra*, *Mougeotia* sp.

3. Charetum strigose: доминант *Ch. strigosa* A. Braun, число видов 3, встречаются *D. aduncus* Warnstorf, *Potamogeton perfoliatus* L.; проективное покрытие 90 %; площадь 11 812 м<sup>2</sup>; распространен в центральном секторе озера на глубинах 20—40 см; грунт илистый.

4. *Caulinietum flexilis*: монодоминантное сообщество выявлено в литорали восточного сектора на глубинах 2—30 см; площадь 1 085 м<sup>2</sup>; проективное покрытие до 100 %; грунт илистый.

5. *Potametum perfoliatus*; доминант *P. perfoliatus*, число видов — 2, сопутствующий вид *Chara* sp., проективное покрытие до 80 %; площадь 64 141 м<sup>2</sup>, растет на глубинах 35—60 см в центральном секторе озера; грунт илистый.

6. *Potametum berchtoldii*: доминант *Potamogeton berchtoldii* Fieb., число видов 2, изредка встречается *Sagittaria natans* Pall, проективное покрытие до 100 %; площадь 14 308 м<sup>2</sup>; распространен в литорали западного сектора на глубинах 5—20 см; грунт илистый.

7. *Myriophyllum sibiricum*: доминант *Myriophyllum sibiricum* Kom.; число видов — 3, сопутствующий вид *Chara* sp., *Utricularis vulgaris* L.; проективное покрытие 35—65 %, площадь 6 597 м<sup>2</sup>; встречается в юго-западном секторе, на глубинах 5—15 см; грунт илистый.

8. *Callitriche hermaphroditica*; доминант *Callitriche hermaphroditica* L.; моноспецифическое сообщество с проективным покрытием до 50 %; встречающееся между валунов разного размера в южном побережье озера на глубине 5—15 см; занимает площадь 424,5 м<sup>2</sup>; грунт песчаный.

9. *Sagittarietum natans*: доминант *S. natans*; число видов — 3, встречаются *S. emersum*, *Isotes echinospora*; проективное покрытие до 100 %; образует пояс на глубинах 10—30 см в северной части озера; площадь 27 784 м<sup>2</sup>; грунт илистый.

10. *Sagittaria—Isotesetum echinospora*: доминанты: *S. natans* и *I. echinospora*; число видов — 4, встречается *S. emersum*, *P. compressus*; сообщество формирует пояс в северном (глубины 35—40 см) и восточном (25—30 см) секторах; площадь 19 444 м<sup>2</sup>; грунт илистый.

11. *Sagittaria—Sparganiumetum emersum*: доминанты *S. natans* и *S. emersum*; число видов — 3; встречаются *Chara* sp.; сообщество распространено в южном секторе озера на глубинах 20—45 см; проективное покрытие 45—100 %; площадь 36 704 м<sup>2</sup>; грунт илистый.

12. *Sagittaria—Herbae*: доминант *S. natans*, число видов 8; сопутствующие виды *Chara* sp., *D. aduncus*, *P. berchtoldii*, *P. compressus*, *Potamogeton gramineus* L., *P. perfoliatus*; проективное покрытие 70—85 %, встречаются в восточном (глубины 15—25 см) и южном (15—20 см) секторах озера; площадь 15 113 м<sup>2</sup>; грунт илистый.

13. *Sparganiumetum emersum*: доминант *S. emersum*, число видов — 4; встречаются *I. echinospora*; *Chara* sp., *P. perfoliatus*, *P. compressus*; сообщество распространено по северному (глубины 30—40 см), западному (30—35 см), восточному (35—40 см) секторам озера; проективное покрытие 50—90 %; общая площадь 66 024 м<sup>2</sup>; грунт илистый.

14. *Lemnetum trisulca*: доминант *Lemna trisulca* L.; число видов — 7; *L. trisulca* формирует скопления

в придонном слое, в толще воды и на поверхности воды обнаружены группировки цианобактерий *Oscillatoria princeps*, *Gloeotrichia pisum*, *Phormidium viride* (Vauch. ex Gom.t) Lemm., виды рода *Spirogyra*. Также изредка встречаются *Chara* sp. и редкие скопления *Lemna minor* L.; проективное покрытие до 100 %, встречается в разливах источника Чарский горячий ключ, на глубинах 15—30 см; площадь 20 м<sup>2</sup>.

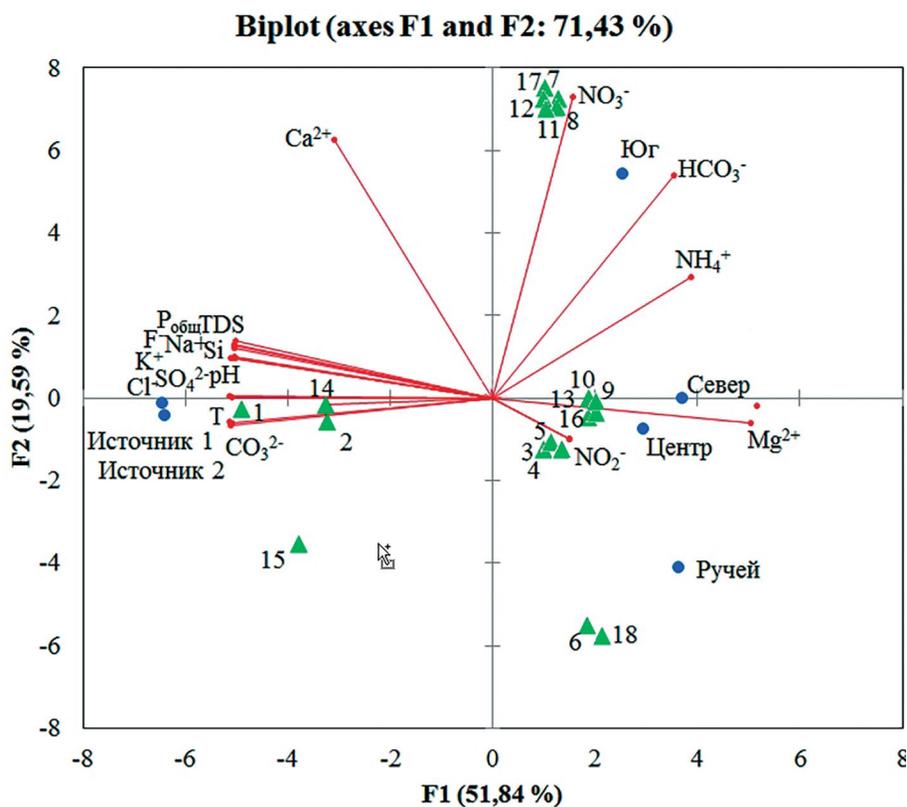
15. *Scrispetum tabernaemontani*: доминант *Scirpus tabernaemontani* C. C. Gmel.; число видов — 5; встречаются *Carex aquatilis* Wahlenb., *Equisetum palustre* L., *Eleocharis palustris*, *Equisetum palustre* L.; проективное покрытие 70—98 %; в озере распространен вдоль западного берега, заходя до глубины 20 см; общая площадь 10 800 м<sup>2</sup>; формирует монодоминантные сообщества на участке между источником Чарский горячий ключ и оз. Арбакалик; грунт песчаный.

16. *Carexetum nigra*: доминант *Carex nigra* subsp. *juncea* (Fr.) Soó; число видов — 5; встречаются *Carex vesicata* Meinsh., *Carex meyeriana* Kunth, *Sc. tabernaemontani*, *Eriophorum vaginatum* L.; проективное покрытие 50—70 %; занимает площадь 17 300 м<sup>2</sup>; распространен вдоль северо-западного, северного и северо-восточного берегов заходя в воду до глубины 10 см; грунт илисто-песчаный.

17. *Carexetum aquatilis*: доминант *C. aquatilis*, число видов — 3; встречаются *Carex utriculata* Boott, *C. nigra*; проективное покрытие до 30 %; занимает площадь 1 490 м<sup>2</sup>; на глубинах 0—5 см, на каменисто-песчаной литорали южного сектора.

18. *Hippurisetum vulgaris*: доминант *Hippuris vulgaris* L.; монодоминантное сообщество на площади 5 503 м<sup>2</sup>, встречается в юго-западной оконечности озера; грунт песчано-илистый.

*Факторы среды, определяющие растительность.* Для выявления ведущих факторов среды, определяющих распределение фитоценозов в исследованных объектах, проведен факторный анализ методом главных компонент. Факторный анализ переменных позволил выделить три главных компоненты, определяющие 84.29 % дисперсии фактических данных. Для визуализации результатов построен масштабированный биграф взаимных расположений станций наблюдений и исследованных переменных (рис. 4). Первая компонента, на долю которой приходится 51.84 % общей дисперсии, характеризуется высокой отрицательной корреляцией с температурой воды, рН, минерализацией, концентрацией  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  и  $\text{P}_{\text{общ}}$ . Положительная связь с концентрацией  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-$ . Выделенные факторные нагрузки определяют развитие фитоценозов *Cyano-phytetum*, *Charetum* sp., *Lemnetum trisulca*, *Scrispetum tabernaemontani* в источнике Чарский горячий ключ. Вторая компонента (19.59 % дисперсии) характеризуется положительной связью с концентрацией  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , определяя состав растительности в южном секторе озера. В третью компоненту (12.87 %) объединены фитоценозы центрального и северного секторов.



**Рис. 4.** Масштабированный биграф ориентации между станциями исследования, их физико-химическими характеристиками и фитоценозами в пространстве двух компонент. Обозначения абиотических параметров представлены в табл. 1, нумерация фитоценозов соответствует тексту.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассмотренные результаты показывают, что в источнике Чарский горячий ключ представители отдела Cyanobacteria являются доминирующей группой. Важнейшим экологическим фактором, влияющим на развитие Cyanobacteria в термах, является температура воды (Никитина, 2000). В горячих выходах источника Чарский горячий ключ при температурах от +35 до +50 °С преобладает *Leptolyngbya gelatinosa*. Согласно J. Komárek и K. Anagnostidis (2005) вид описан из Грузии, известен также из Австрии, России и Новой Зеландии. По мере снижения температуры воды разнообразие цианобактерий растет. Достаточно богатая флора развивается при температурах от +26° до +30 °С и от +46° до +50 °С. Согласно исследованиям В. Н. Никитиной (2000) оптимум для развития цианобактерий лежит в пределах +31...+40 °С. Эти значения температуры можно считать жизненно благоприятной областью для Cyanobacteria. При меньших температурах (области тепловых выходов) Cyanobacteria вступают в конкурентные отношения с харовыми водорослями, а также представителями высшей водной растительности. Обнаруженная нами зависимость видового разнообразия Cyanobacteria от температуры воды совпадает с данными

ряда исследователей (Anagnostidis, 1961; Потапова, Брянская, 2008).

На формирование видового состава Cyanobacteria в термальных источниках оказывает влияние и pH. Источник Чарский горячий ключ характеризуется щелочной средой (pH = 9.3), что несколько выше оптимума, приведенного в литературе для Cyanobacteria. Так, наиболее благоприятными для развития богатых видами ценозов Cyanobacteria являются источники с нейтральными и близким к нейтральным значениями pH. Другие авторы в качестве оптимальных условий приводят щелочные биотопы (pH от 7.8 до 8.5) (Castenholz, 1969; Binder *et al.*, 1972).

Результаты исследования показывают, что доминирующий таксономический состав флоры оз. Арбакалир в целом характерен для водоемов России и мира (Распопов и др., 2011). Во флоре озера преобладают представители укореняющихся гидрофитов, высока доля укореняющихся гидрофитов с плавающими на поверхности воды листьями. Свободно плавающие в толще воды гидрофиты в озере отсутствуют, однако виды рода *Lemna* встречаются в прибрежной зоне источника.

Впервые за многолетние исследования разнотипных водоемов Забайкалья (Базарова, Пронин, 2006, 2009; Базарова, 2012; Базарова, Куклин, 2021) обследован водоем, в составе флоры которого установлено

произрастание сразу трех реликтовых видов (*C. strigosa*, *C. flexilis*, *I. echinospora*), что является редким явлением не только на территории Забайкалья, но в России. Видовое разнообразие макрофитов озера Арбакаликр чуть выше видового состава реликтовых озер Камско-Бакалдинских болот Нижегородской области. В озере Большое Плотово — 20 видов, Малое Плотово — 39, Красное — 25, Рябиновое — 21, Безрыбное — 19. При этом только в озере Безрыбное также одновременно растут 3 реликтовых вида *C. strigosa*, *C. flexilis*, *I. echinospora* (Беляков и др., 2021). В древних озерах Европейского северо-востока России насчитывают больше видов: озеро Ямозеро — 57 видов, Синдор — 63 вида и 1 гибрид; Донты — 88. Однако в них не присутствуют вышеперечисленные реликты (Тетерюк, 2012).

Мы предполагаем, что сложившийся состав и структура растительного покрова оз. Арбакаликр — результат комплексного сочетания особенности происхождения (ледово-моренный), температурного режима и гидрохимического состава вод. Эти факторы сформировали и поддерживают благоприятные условия для роста и развития реликтовых видов *I. echinospora*, *C. flexilis*, *C. strigosa* — первые два включены в Красную книгу РФ (Красная .., 2021), последний рекомендован.

По мнению М. Г. Попова (1955), *I. echinospora* является палеоарктическим реликтом, остатком теплолюбивой «среднеевропейской флоры». Известно несколько местонахождений *I. echinospora* в оз. Байкал, в Бурятии (Азовский, Чепинога, 2007). В Забайкальском крае *I. echinospora* ранее был указан в протоке, соединяющей озера Иван и Тасей (Флора .., 1988), в настоящее время данная протока высохла. Большой интерес представляет и находка ледникового реликта *C. flexilis* (Бирюкова и др., 2020). В Забайкалье и в России в целом отмечается рост числа находок данного вида. В 2015 г. вид регистрируется в пойме р. Аргунь. Одним из факторов прорастания семян считается температура воды более +20 °С (Красная .., 2003). *C. strigosa* — это ледниковый реликт Европы (Auderset, Schwarzer, 2012). По всему ареалу он является редким, находящимся под угрозой исчезновения. Новые находки вида в Северном Прибайкалье позволили предполагать более широкое распространение *C. strigosa* в этом регионе (Романов и др., 2014), что подтверждается нашей находкой. Кроме данных реликтовых видов в озере растет *Potamogeton natans* L. Это редкий для Забайкалья вид, встречающийся в ледниково-моренных озерах Хентей-Даурского нагорья: оз. Шебетуй (бассейн оз. Байкал) и в горных озерах бассейна р. Онон (Сохондинский заповедник). Согласно определителю «Флора Сибири» (Флора .., 1988) вид приводится также для высокогорных озер Каларского округа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Видовой состав и фитоценологическое разнообразие растительности оз. Арбакаликр и источника Чарский

горячий ключ — результат комплексного сочетания особенностей происхождения водоемов и современных физико-химических условий среды. Ведущими факторами, влияющими на распределение фитоценозов, являются температура воды, водородный показатель, минерализация, концентрация основных катионов, анионов и биогенных элементов. Выявленная взаимосвязь происхождения и физико-химических показателей водоема дает возможность предположить, что в озерах подобного типа в России и в мире могут произрастать редкие реликтовые виды (по одному или в комплексе). Комплексные экологические исследования северных озер Забайкальского края, в частности озера Чарской котловины, могут стать полигоном для выявления редких и исчезающих видов флоры и фауны.

Результаты исследования на озере Арбакаликр и источнике Чарский горячий ключ служат основой для мониторинговых наблюдений, особенно в настоящее время — на фоне роста туристического и бальнеологического интереса к данным объектам.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания ИПрЭК СО РАН по теме № FUFР-2021-0006 «Геоэкология водных экосистем Забайкалья в условиях современного климата и техногенеза. Основные подходы к рациональному использованию вод и их биологических ресурсов».

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Азовский М.Г., Чепинога В.В. Флора высших растений озера Байкал. Иркутск: Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2007. 157 с.
- Базарова Б.Б. Многолетние изменения растительности оз. Кенон (Забайкальский край) // Известия ИГУ. 2012. № 5. С. 18—23.
- Базарова Б.Б., Куклин А.П. О современном состоянии и многолетней динамике флоры и растительности озера Гусиное (Республика Бурятия) // Экосистемы. 2021. № 25. С. 72—81.
- Базарова Б.Б., Пронин Н.М. Динамика водной растительности Чивыркуйского залива // Сибирский экологический журнал. 2006. № 13(6). С. 767—772.

- Базарова Б.Б., Пронин Н.М. Многолетние изменения водной растительности озера Шучье (Еравно-Харгинская озерная группа, Забайкалье) // Вестник КрасГАУ. 2009. № 4. С. 121—125.
- БАМ. Каларский район. Чита, 2014. 400 с.
- Беляков Е.А., Гарин Э.В., Бирюкова О.В., Шестакова А.А. Флора макрофитов и особенности зарастания некоторых реликтовых озер Камско-Бакалдинской группы болот (Нижегородская область) // Фиторазнообразии Восточной Европы. 2021. № 15(3). С. 5—38. <https://doi.org/10.24412/2072-8816-2021-15-3-5-38>
- Бирюкова О.В., Чкалов А.В., Воротников В.П., Сырова В.В., Шестакова А.А., Широков А.И., Соловьев А.А. Новые данные по редким и охраняемым видам во флоре Нижегородской области // Фиторазнообразии Восточной Европы. 2020. № 14(2). С. 146—149. <https://doi.org/10.24411/2072-8816-2020-10072>
- Голлербах М.М., Косинская Е.К., Полянский В.И. Определитель пресноводных водорослей СССР. Вып. 2. Сине-зеленые водоросли. М.: Сов. наука, 1953. 652 с.
- Голлербах М.М., Красавина Л.К. Определитель пресноводных водорослей СССР. Т. 14. Харовые водоросли. М.-Л.: Акад. наук СССР, Ленингр. отд-ние, 1983. 190 с.
- Дьяченко А.П. Мхи Среднего Урала. Определитель распространенных видов по рисункам. Екатеринбург: Урал. гос. ун-т, 1996. 168 с.
- Катанская В.М. Высшая водная растительность континентальных водоемов СССР. Методы изучения. Л: Наука, Ленингр. отд-ние, 1981. 187 с.
- Красная книга Забайкальского края. Растения. Новосибирск: ООО «Дом мира», 2017. 384 с.
- Красная книга Республики Мордовия. Т. 1. Саранск: Мордовское книжное изд-во, 2003. 288 с.
- Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). 2021. <https://redbookrf.ru/>
- Ломоносов И.С., Кустов Ю.И., Пиннекер Е.В. Минеральные воды Прибайкалья. Иркутск: Вост.-Сиб. кн. изд-во, 1977. 244 с.
- Никитина В.Н. Синезеленые водоросли термальных местообитаний. Автореф. дис. докт. биол. наук. СПб.: СПбГУ, 2000. 44 с.
- Папченков В.Г. Растительный покров водоемов и водотоков Среднего Поволжья. Ярославль: ЦМП МУБиНТ, 2001. 200 с.
- Попов М.Г. Флора Байкальской Сибири и ее происхождение // Новая Сибирь: литературно-художественный альманах Иркутского отделения Союза писателей СССР. Кн. 33. Иркутск, 1955. С. 302—319.
- Потапова З.М., Брянская А.В. Влияние температуры на распределение цианобактерий в гидротермах северного Прибайкалья // Изв. Иркутского ГУ. 2008. № 1 (1). С. 123—128.
- Распопов И.М., Папченков В.Г., Соловьева В.В. Сравнительный анализ водной флоры России и мира // Изв. Самарского НЦ РАН. 2011. № 13 (1). С. 16—27.
- Романов Р.Е., Чемерис Е.В., Вишняков В.С., Чепинова В.В., Азовский М.Г., Куклин А.П., Тимофеева В.В. *Chara strigosa* (Streptophyta: Charales) в России // Бот. журн. 2014. № 99 (10). С. 1148—1161.
- Рундина Л.А. Зигнемовые водоросли России. СПб.: Наука, 1998. 351 с.
- Свириденко Б.Ф., Мамонтов Ю.С., Свириденко Т.В. Использование гидромacroфитов в комплексной оценке экологического состояния водных объектов Западно-Сибирской равнины. Сургут: ООО «Студия рекламы «Матрешка», 2012. 231 с.
- Тетерюк Б.Ю. Флора древних озер Европейского Северо-Востока России // Изв. Самарского НЦ РАН. 2012. № 14 (1—1). С. 82—90.
- Флора Сибири. Т. 1. Новосибирск: Наука, 1988. 200 с.
- Флора Сибири. Т. 6. Новосибирск: Наука, 1993. 310 с.
- Флора Сибири. Т. 11. Новосибирск: Наука, 1997. 296 с.
- Юнгер В.П., Мошкова Н.О. Едогониевые водоросли — Oedogoniales. Киев: Наукова думка, 1993. 412 с.
- Allan J.D., Castillo M.M. Stream Ecology: Structure and Function of Running Waters. Heidelberg, 2007. 436 p.
- Anagnostidis K. Untersuchungen über die Cyanophyceen einiger Thermen in Griechenland. Institut für Systematische Botanik und Pflanzengeographie der Universität, 1961. 322 p.
- Auderset J.D., Schwarzer A. Liste rouge characees. Espèces menacées en Suisse, état 2010. L'environnement pratique. Is. 1213. Geneve, 2012. 72 p.
- Biggs B.J., Hickey C.W. Periphyton responses to a hydraulic gradient in a regulated river in New Zealand // Freshwater Biol. 1994. № 32 (1). P. 49—59. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1994.tb00865.x>
- Binder A., Wilson K., Zuber H. C-phycocyanin from the thermophilic blue-green alga *Mastigocladus laminosus*, isolation, characterization and subunit composition // FEBS letters. 1972. № 20 (1). P. 111—116.
- Castenholz R.W. Thermophilic blue-green algae and the thermal environment // Bacteriological Reviews. 1969. № 33 (4). P. 476—504.
- Guiry M.D., Guiry G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. 2022. <https://www.algaebase.org/>; searched on 10.04.2022.
- Komárek J. Cyanoprokaryota. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Berlin, 2013. № 19 (3). P. 1130 p.
- Komárek J., Anagnostidis K. Cyanoprokaryota. 2. Teil: Oscillatoriales. Süßwasserflora von Mitteleuropa. München, 2005. P. 1—759.

## Flora and vegetation in the Lake Arbakalir and the spring Charsky Goryachy Klyuch (Charskaya Basin, Transbaikalia)

© 2024 В. В. Bazarova\*, #, А. Р. Kuklin\*, Т. V. Zhelibo\*, L. V. Zamana\*

\*Institute of Natural Resources, Ecology and Cryology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Hedorezova, 16a, Chita, 672014 Russia

#E-mail: bazarovabb@yandex.ru

As a result of comprehensive researches in the Lake Arbakalir and the Spring Charsky Goryachy Klyuch during the growing season in 2021, the physical and chemical parameters of water, species and phytocenotic diversity of vegetation were studied. 56 taxa from 7 divisions of which 31 species belong to flowering plants, 22 species to macroalgae, one species in each to bryophytes, horsetails and lycophytes were identified in the flora of water bodies. Two species are included in the Red Book, both at the federal and regional levels. Two species are classified as relict. The structure of the flora contains species of three ecotypes, of which 38 species (67.9%) belong to true aquatic plants. 18 associations from 12 formations were identified in the syntaxonomic structure of aquatic and coastal aquatic vegetation. Based on factor analysis, the main factors influencing the distribution of phytocenoses are water temperature, pH, mineralization, and main cation, anion and nutrient contents.

*Key words:* *Isoetes echinospora*, *Caulinia flexilis*, relict species, cyanobacterial mats, factor analysis.

## ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ПРОИЗРАСТАНИЯ НА РОСТ, РАЗВИТИЕ И РЕПРОДУКТИВНЫЙ УСПЕХ *ORCHIS PURPUREA* HUDS. В ЮГО-ВОСТОЧНОМ КРЫМУ

© 2024 г. В. Ю. Летухова\*<sup>@</sup>, И. Л. Потапенко\*

\*ФГБУН “Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского – природный заповедник РАН”,  
пгт. Курортное, ул. Науки, 24, г. Феодосия, Крым, 298188 Российская Федерация

@E-mail: letukhova@gmail.com

Поступила в редакцию: 31.05.2023

После доработки 21.09.2023

Принята к публикации 21.09.2023

Проведено сравнение организменных и популяционных параметров ятрышника пурпурного — *Orchis purpurea* Huds. (Orchidaceae) в различных условиях произрастания. Определены онтогенетический тип ценопопуляций, индексы возрастности, эффективности, восстановления, жизненность особей, индекс пластичности. Наибольшая численность растений отмечена в лесных сообществах. Демографические и морфологические параметры ценопопуляций незначительно различались между собой. Отмечены незначительные колебания жизненности особей в зависимости от условий местообитания и условий вегетационного сезона. Успешность опыления растений степных биотопов гораздо выше, чем у растений лесных биотопов: средняя завязываемость плодов в степных биотопах составила 39.63%, в лесных — 4.97–5.84%. Тем не менее, это не повлияло на репродуктивный успех, главным индикатором которого является наличие новых поколений растений: во всех изученных ценопопуляциях отмечена высокая доля особей прегенеративного периода. Установлено, что *O. purpurea* обладает широкой экологической амплитудой и высокой адаптивностью к фитоценоотическим изменениям местообитаний. Вид способен произрастать в широком спектре экологических условий, не меняя своих морфологических, демографических и онтогенетических параметров.

**Ключевые слова:** *Orchis purpurea* Huds., Крым, демографические параметры, морфологические признаки, жизненность, успешность опыления.

**DOI:** 10.31857/S1026347024030104, **EDN:** VAICIM

В результате негативного воздействия различных природных и антропогенных факторов растительный мир нашей планеты в настоящее время сталкивается с серьезными угрозами и деградацией на значительных территориях. В первую очередь это относится к редким и уязвимым видам растений, к которым принадлежат и все представители семейства Orchidaceae. Их редкость, в первую очередь, обусловлена особенностями биологии (низким уровнем опыления, низким процентом прорастания семян, длительным прегенеративным периодом развития). На состояние популяций и репродуктивный успех орхидных могут оказывать влияние и условия произрастания: растительные сообщества, условия освещения и увлажнения. Только всестороннее исследование биологии и экологии растений станет основой разработки методов и подходов мониторинга видов и будет способствовать успешному сохранению их природных популяций.

Мониторинг популяций представителей семейства Orchidaceae на территории Юго-Восточного Крыма нами проводится с 2014 г. (Летухова, Потапенко, 2017;

Letukhova, Potapenko, 2021). Объектом данного исследования стал редкий охраняемый вид ятрышник пурпурный — *Orchis purpurea* Huds. (Orchidaceae). Вид занесен в Красную книгу Российской Федерации и региональные Красные книги республик Адыгеи, Дагестана, Кабардино-Балкарской, Карачаево-Черкесской, Крыма, Северной Осетии — Алании, Чеченской, Краснодарского и Ставропольского краев и г. Севастополя (Плантариум, 2023), в Конвенцию “О международной торговле видами дикой фауны и флоры, находящимися под угрозой исчезновения” (CITES, 2023), Европейский Красный список (Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats, 1979), Красный список МСОП (Rankou, 2011).

*O. purpurea* — это многолетнее корнеклубневое растение с цветоносным стеблем до 90 см высотой. Соцветие густоцветковое, часто очень крупное (до 25 см длиной). Цветки пурпурных тонов различной интенсивности с темно-пурпурными пятнами в средней части и более темным краем. *O. purpurea* принадлежит к категории обманывающих орхидей:

ее цветки не выделяют нектар и привлекают опылителей своей яркой окраской. *O. purpurea* встречается в большей части Европы (кроме севера) и в Малой Азии. В Крыму вид распространен в горной части, отмечен на лесных полянах, опушках, в зарослях кустарников, а также в дубовых, буковых, грабинниковых и смешанных лесах (Красная книга республики Крым, 2015; Фатерыга и др., 2019).

Цель настоящей работы — сравнение организменных и популяционных параметров, а также изучение состояния ценопопуляций *O. purpurea* в различных эколого-ценотических условиях Юго-Восточного Крыма.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На территории Юго-Восточного Крыма *O. purpurea* отмечен как в степных (Меганом, Узун-Сырт, Тепе-Оба, Карадаг), так и в лесных ценопопуляциях (Карадаг, Кизилташ) (Миронова, Шатко, 2001, 2011; Шатко, Миронова, 2011, 2012; Миронова, Фатерыга, 2015). Вид встречается как одиночно, так и группами. Нами для исследования были выбраны три наиболее многочисленные ценопопуляции (ЦП): две в лесных сообществах и одна — в степном. Ценопопуляции из лесных сообществ располагались в горном массиве Кизилташ, ценопопуляция из степного сообщества — на хребте Тепе-Оба (рис. 1). Исследования проводились в 2015–2022 гг.

Горный массив Кизилташ расположен севернее п. Краснокаменка и западнее п. Щebetовка (поселки, подчиняющиеся Феодосийскому горсовету). Эта

территория входит в состав Главной гряды Крымских гор и имеет площадь около 1500 га. В настоящее время эта территория охранного статуса не имеет. Хребет Тепе-Оба, расположенный вблизи г. Феодосия, протянулся на 8–10 км с востока на запад, имеет максимальную высоту 290 м н. у. м. На его территории находится Государственный природный ботанический заказник регионального значения, площадь которого — 1200 га. Характеристики ценопопуляций следующие.

ЦП1 расположена в начале маршрута, ведущего в Кизилташский Свято-Стефано-Сурожский монастырь. Это трансекта длиной 300 м и шириной 10 м. Высота н. у. м. — 270–320 м. Тропа проходит по дубово-грабовому лесу. В древесном ярусе доминируют *Carpinus orientalis* Mill., *Quercus pubescens* Willd., *Fraxinus excelsior* L., *Cornus mas* L. Древесный ярус имеет высоту 3–5 м, сомкнутость крон 6–7. Имеется небольшой подлесок (проективное покрытие 10%), в нем отмечены *Ligustrum vulgare* L., *Cotinus coggygria* Scop. Травянистый ярус сильно разрежен, проективное покрытие 20%. Отличительной особенностью травянистого яруса является преобладание в его составе *Carex divulsa* Stokes и *Piptatherum holciforme* (M. Bieb.) Roem. et Schult. Имеется мощная подстилка (100%).

ЦП2 расположена в конце маршрута, ведущего в Кизилташский Свято-Стефано-Сурожский монастырь. Это трансекта длиной 200 м и шириной 10 м. Высота н. у. м. — 330–350 м. Это тот же дубово-грабовый лес, однако в растительном сообществе появляются *Torminalis glaberrima* (Gand.) Sennikov & Kurtto, *Tilia dasystyla* subs. *caucasica* (V. Engl.) Pigott,



Рис. 1. Локалитеты *Orchis purpurea* в Юго-Восточном Крыму (цифрами обозначены номера ценопопуляций).

а в травянистом ярусе — *Laser trilobum* (L.) Borkh., *Physospermum cornubiense* (L.) DC. Высота древесного яруса — 5 м, сомкнутость крон — 7–8. Проективное покрытие травянистого яруса — 30 %.

ЦПЗ была выделена в восточной части Тепе-Оба в степном разнотравье. Участок площадью 20×15 м расположен на высоте 100 м н. у.м, на склоне СЗ экспозиции, угол склона 5°. В составе растительного сообщества незначительно присутствует кустарниковый ярус (проективное покрытие 5 %, высота 1.5 м), состоящий из *Cerasus mahaleb* (L.) Mill., *Cotoneaster tauricus* Pojark., *Crataegus pallasii* Griseb., *Rosa corymbifera* Borkh., *Rosa spinosissima* L. Травянистый ярус хорошо развит: проективное покрытие 90 %, высота 25 см. В составе доминантов отмечены: *Dactylis glomerata* L., *Festuca valesiaca* Schleich. ex Gaudin, *Poa angustifolia* L. Также присутствуют следующие виды: *Eryngium campestre* L., *Galatella villosa* (L.) Rchb.f., *Linum pallasianum* Schult., *Medicago falcata* subsp. *glandulosa* (W.D.J. Koch) Kozuharov, *Orchis purpurea*, *Teucrium chamaedrys* L., *Veronica multifida* L. и др.

У всех цветущих растений в ценопопуляциях измеряли их биоморфологические параметры: высоту, число листьев, длину и ширину первого и второго листа, длину соцветия, число цветков. На основании этих признаков были рассчитаны следующие индексы: формы первого и второго листа (длина листа/ширина листа), отношение числа цветков к длине соцветия и отношение высоты растения к длине соцветия.

Изучение онтогенетической структуры ценопопуляций проводили по общепринятым методам (Ценопопуляции растений..., 1977). Численность ценопопуляций определяли пересчетом всех растений с учетом их онтогенетических состояний. В качестве учетной единицы считали парциальный побег. Онтогенетические состояния растений выделены на основании следующих морфологических признаков: однолистные растения отнесены к ювенильным особям (j), двулистные — к имматурным (im), трехлистные — к виргинильным (v), а растения, сформировавшие четыре и более листа, отнесены к генеративным особям. При этом мы учитывали, что у растений *O. purpurea*, вступивших в генеративный период, в отдельные годы может не происходить образования генеративных органов, однако при визуальном осмотре зачастую на них присутствуют следы цветения в прошлом (усохшие соцветия). Генеративная группа, в свою очередь, была поделена на: молодые генеративные растения ( $g_1$ ) — растения с четырьмя листьями (в некоторых случаях растение могло давать генеративный побег, сформировав три листа), зрелые генеративные растения ( $g_2$ ) — с пятью листьями и старые генеративные растения ( $g_3$ ) — с шестью и более листьями. Субсенильные и сенильные особи в наших ценопопуляциях встречены не были.

Для детальной характеристики демографической структуры ценопопуляций использованы индексы возрастности ( $\Delta$ ), эффективности ( $\omega$ )

и восстановления ( $I_v$ ). Возрастной тип ценопопуляций определяли по классификации “дельта-омега” Л. А. Животовского (Животовский, 2001), основанной на совместном использовании индексов возрастности ( $\Delta$ ) (Уранов, 1975) и эффективности ( $\omega$ ) (Животовский, 2001). При оценке эффективности самоподдержания ценопопуляций использован индекс восстановления ( $I_v$ ), который мы рассчитывали как отношение количества ювенильных, имматурных и виргинильных особей к количеству генеративных экземпляров (Жукова, 1987).

Жизненность особей оценивали по индексу виталитета (IVC), который определяется по размерному спектру особей в популяции по формуле (Ишбирдин, Ишмуратова, 2004):

$$IVC = \frac{\sum_{i=1}^N X_i / \bar{X}_i}{N},$$

где  $X_i$  — значение  $i$ -го признака в ценопопуляции,  $\bar{X}_i$  — среднее значение  $i$ -го признака для всех ценопопуляций,  $N$  — число признаков. Индекс пластичности рассчитывали по следующей формуле:  $ISP = IVC_{\max} / IVC_{\min}$  (Ишбирдин, Ишмуратова, 2004).

При изучении успешности опыления определяли завязываемость плодов: процентное отношение количества завязавшихся плодов к количеству цветков в соцветии.

Латинские названия сосудистых растений приведены в соответствии с базой данных “POWO” (POWO, 2023).

Предварительную обработку и анализ данных проводили с помощью Microsoft Office Excel 2010. Статистический анализ проводили в программе R версии 4.1.0. Мы использовали W-критерий Шапиро—Уилка для проверки выборок значений морфометрических параметров на нормальное распределение. В случае если выборки отвечали критерию нормального распределения, мы использовали параметрические методы в статистике (дисперсионный анализ с апостериорным сравнением по методу Тьюки), в случае если выборки не отвечали критерию нормального распределения, мы использовали непараметрические методы (тест Крускала—Уолиса, коэффициент ранговой корреляции Спирмена) (Зайцев, 1984; Янцев, 2007).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Распределение особей *O. purpurea*, произраставших в лесных сообществах, было комбинированным регулярно-контагиозным. В ЦП1 растения встречались единично или небольшими группами (до 20—30 особей). В ЦП2 растения были собраны в более многочисленные группы, самая крупная из которых насчитывала 117 особей на площади 4 м<sup>2</sup>. Подобные группы встречались регулярно на протяжении

всего маршрута. Распределение особей в популяции из степного местообитания (ЦПЗ) было диффузным. Расстояние между особями неодинаковое, отдельные особи располагались внутри кустарников. Подобные скопления особей в степном сообществе повторялись каждые 50–100 м.

Наибольшая численность вида была отмечена в ЦП2: в разные годы наблюдений этот показатель варьировал от 347 до 482 особей. Численность особей прегенеративного периода варьировала от 242 до 369, численность особей генеративного периода — от 95 до 149. Таким образом, во все годы наблюдений в онтогенетическом спектре преобладали особи прегенеративного периода. Средние значения составили: индекс возрастности — 0.15, индекс эффективности — 0.37, индекс восстановления — 2.65. Согласно классификации “дельта-омега” тип ценопопуляции не менялся и был отнесен к категории “молодая”. В ЦП1 численность варьировала от 52 до 167 особей. Численность особей прегенеративного периода

варьировала от 25 до 106, численность особей генеративного периода — от 27 до 66. В онтогенетическом спектре также преобладали особи прегенеративного периода, но не так существенно, как в ЦП2. Демографические показатели в разные годы наблюдений незначительно колебались и в среднем составили: индекс возрастности — 0.23, индекс эффективности — 0.48, индекс восстановления — 1.38. Такие показатели также позволили отнести по классификации “дельта-омега” ЦП1 к категории “молодая”. В ЦП3 в 2022 году численность составила 77 особей. В отличие от лесных ценопопуляций, здесь количество особей генеративного периода превышало количество таковых прегенеративного периода (соответственно 42 и 35). Однако это преобладание было незначительным, и по классификации “дельта-омега” эта ценопопуляция также была отнесена к категории “молодая”. Демографические показатели были следующими: индекс возрастности — 0.30, индекс эффективности — 0.60, индекс восстановления — 0.83 (табл. 1).

**Таблица 1.** Демографическая характеристика ценопопуляций *Orchis purpurea* в Юго-Восточном Крыму

Год	Общее количество особей	Возрастные состояния, количество особей						Демографические показатели			Тип популяции
		j	im	v	g <sub>1</sub>	g <sub>2</sub>	g <sub>3</sub>	Индекс возрастности, Δ	Индекс эффективности, ω	Индекс восстановления, I <sub>в</sub>	
<b>ЦП1</b>											
2015	157	40	44	22	26	19	6	0,17	0.41	2.08	Молодая
2016	56	10	7	12	8	10	9	0.28	0.54	1.07	
2017	149	38	31	19	18	26	17	0.23	0.47	1.44	
2018	52	5	8	12	10	9	8	0.29	0.58	0.93	
2019	152	44	28	19	23	20	18	0.22	0.45	1.49	
2020	167	39	37	25	35	27	4	0.19	0.47	1.53	
2021	60	21	6	5	14	9	5	0.22	0.48	1.14	
2022	113	29	21	15	27	17	4	0.20	0.47	1.35	
<b>ЦП 2</b>											
2015	374	129	99	51	56	25	14	0.14	0.34	2.94	Молодая
2016	443	181	93	57	62	29	21	0.14	0.33	2.96	
2017	434	131	86	68	56	61	32	0.19	0.42	1.91	
2018	424	125	107	83	73	26	10	0.14	0.36	2.89	
2020	371	79	100	79	55	38	20	0.17	0.41	2.28	
2021	347	102	73	67	59	38	8	0.16	0.40	2.31	
2022	482	166	97	106	67	34	12	0.13	0.35	3.27	
<b>ЦП3</b>											
2022	77	11	6	18	13	17	12	0.30	0.60	0.83	Молодая

Морфометрические параметры генеративных растений *O. purpurea* в исследованных ценопопуляциях представлены в табл. 2. Высота надземного побега изменяется в пределах от 9 см до 70 см. Однако средние значения этого параметра в трех ценопопуляциях примерно одинаковы (разница между самыми высокими и самыми низкими значениями составила всего 2.06 см). Средние значения остальных морфологических параметров в ценопопуляциях также не сильно различались (за исключением числа цветков в соцветии). Длина первого листа варьирует от 5.5 см до 22 см; ширина — от 3.0 см до 7.5 см. Длина второго листа варьирует от 7.0 см до 26 см; ширина — от 2.5 см до 7.5 см. Длина соцветия варьирует от 3.0 см до 20 см. Самое большое количество цветков было отмечено в ЦП3 (среднее значение — 38.37; максимальное — 68). Наименьшее количество — в ЦП1 (среднее значение — 33.48; минимальное — 14). Разница между средними значениями составила 4.89 цветка, а между крайними — 54 цветка.

Также в табл. 2 представлены коэффициенты вариации признаков, характеризующие уровень их индивидуальной изменчивости. Уровень изменчивости варьирует от среднего до высокого. При этом наиболее высокий уровень изменчивости был выявлен у параметров, характеризующих генеративную сферу. Так, для длины соцветия он составил от 24.15 % до 51.25 %, для числа цветков — от 24.86 % до 36.38 %, для отношения числа цветков к длине соцветия — от 29.68 % до 39.03 %, для отношения высоты растения к длине соцветия — 22.65 % до 40.89 %.

Анализ распределений изученных морфологических признаков в выборках показал, что большинство из них подчиняется закону нормального распределения. Исключение составили следующие признаки: длина соцветия и отношение высоты растения к длине соцветия. Это позволило применить

для сравнения популяций параметрические методы дисперсионного анализа. При сравнении признаков, не отвечающих закону нормального распределения, был использован критерий Краскела—Уоллиса (табл. 3). Исследования показали, что по большинству морфологических признаков растения, произрастающие в лесных и степных сообществах, достоверно между собой не различаются. Статистически значимые различия обнаружены лишь в таких признаках, как длина, ширина и форма второго листа.

Расчеты индекса виталитета (IVC), произведенные по восьми морфологическим признакам, показали, что средняя жизнеспособность особей в ценопопуляциях варьировала незначительно (табл. 4). Наиболее высокий индекс был отмечен в 2018 г. в ЦП 2 (IVC=1.17), наименее благоприятным для роста растений был 2020 г., когда отмечены самые низкие индексы виталитета (в ЦП1 — 0.80; в ЦП 2 — 0.90). В степной ценопопуляции в 2022 г. средний индекс виталитета не отличался от такового для лесных ценопопуляций. Размерная пластичность составила 1.30—1.35, что соответствует пределам размерной пластичности для многолетних растений (Ишбирдин, Ишмуратова, 2004). Таким образом, выявлено незначительное влияние условий местобитания и вегетационного сезона на морфологические признаки *O. purpurea*.

Успешность опыления, выражающаяся в проценте завязавшихся плодов, у растений степных биотопов оказалась гораздо выше, чем у растений из лесных биотопов (табл. 5). Средняя завязываемость плодов в ЦП3 составила 39.63 %, в то время как в ЦП1 и ЦП2 она составила соответственно 5.84 % и 4.97 %. При этом в ЦП1 была обнаружена достоверная ( $P=0.043$ ) умеренная (по шкале Чеддока) отрицательная корреляция завязываемости плодов с расстоянием до ближайшего соседа с коэффициентом корреляции

**Таблица 2.** Показатели морфологических признаков особей *Orchis purpurea* в различных популяциях

Признак	ЦП1		ЦП2		ЦП3	
	M±m	CV,%	M±m	CV,%	M±m	CV,%
Высота растения, см	39.88±2.50	26.58	39.93±1.52	25.26	41.94±1,78	8.65
Длина первого листа, см	12.46±0.77	25.79	13.45±0.48	23.95	12.75±1.85	30.53
Ширина первого листа, см	4.60±0.20	18.54	4.77±0.14	19.71	4.92±0.48	21.22
Длина второго листа, см	14.20±0.73	21.39	15.68±0.48	20.39	15.80±1.59	22.38
Ширина второго листа, см	4.74±0.18	15.87	4.84±0.14	19.82	5.33±0.42	17.31
Длина соцветия, см	9.70±1.17	51.25	9.02±0.52	37.81	10.0±1.12	24.15
Число цветков	33.48±2.53	32.01	37.11±1.41	24.84	38.37±6.45	36.38
Форма первого листа	2.72±0.14	21.19	2.87±0.10	23.21	2.48±0.43	37.31
Форма второго листа	3.01±0.13	17.31	3.30±0.11	21.06	3.02±0.33	24.53
Отношение числа цветков к длине соцветия	3.96±0.37	39.03	4.42±0.26	38.30	3.80±0.52	29.68
Отношение высоты растения к длине соцветия	4.62±0.30	27.34	4.67±0.16	22.65	4.07±0.77	40.89

**Таблица 3.** Результаты дисперсионного анализа ANOVA и критерия Краскала—Уолиса с апостериорным сравнением

Признак	F (H)	P	Анализ различий (тест Тьюки)
ANOVA			
Высота растений, см	0.330	0.719	–
Длина первого листа, см	2.377	0.095	–
Ширина первого листа, см	1.248	0.289	–
Длина второго листа, см	5.474	0.005	ЦП1–ЦП2 (P=0.005)
Ширина второго листа, см	2.984	0.052	ЦП1– ЦП3 (P=0.041)
Число цветков	2.595	0.077	–
Форма первого листа	2.039	0.132	–
Форма второго листа	5.829	0.003	ЦП1– ЦП2 (P=0.005)
Отношение числа цветков к длине соцветия	2.746	0.066	–
Критерий Краскала–Уоллиса			
Длина соцветия, см	4.351	0.114	–
Отношение высоты растения к длине соцветия	1.306	0.521	–

Примечание. F – критерий Фишера (в случае применения дисперсионного анализа), H – H-критерий (в случае применения критерия Краскала–Уоллиса); P – достоверность различий; “–” – различия незначимы (P>0.05).

**Таблица 4.** Средняя жизненность особей и индекс пластичности в популяциях *Orchis purpurea*

Популяция	Индекс виталитета (IVC)								Индекс пластичности (ISP)
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	
ЦП 1	0.955	0.914	1.070	1.053	1.087	0.804	0.938	1.060	1.35
ЦП 2	1.024	1.040	1.097	1.172	1.086	0.901	0.953	0.962	1.30
ЦП 3	–	–	–	–	–	–	–	1.052	–

**Таблица 5.** Успешность опыления и ее связь с некоторыми морфолого-экологическими параметрами растений

Популяция	Средняя завязываемость плодов, %	Ранговые корреляции Спирмена (r) и уровень достоверности (P)			
		Высота растения, см	Количество цветков	Длина соцветия, м	Расстояние до ближайшего соседа, м
ЦП 1	5.84	r= –0.134; P= 0.608	r= –0.111; P= 0.671	r= –0.059; P= 0.823	<b>r= –0.496;</b> <b>P= 0.043</b>
ЦП 2	4.97	<b>r=0.579;</b> <b>P= 0.006</b>	r=0.261; P= 0.253	r=0.369; P= 0.100	r= –0.147; P= 0.524
ЦП 3	39.63	r= –0.163; P= 0.547	r= –0.246; P= 0.359	r=0.104; P= 0.700	r=0.366; P= 0.163

Примечание: жирным шрифтом обозначены статистически значимые корреляции (P – уровень значимости) изученных параметров с плодозавязываемостью растений *O. purpurea*.

$r = 0.496$ , а в ЦП2 — достоверная ( $P=0.006$ ) заметная (по шкале Чеддока) положительная корреляция завязываемости плодов с высотой растения с коэффициентом корреляции  $r = 0.579$ . В степных местообитаниях (ЦП3) морфолого-экологические параметры не влияли на завязываемость плодов (коэффициенты корреляции статистически незначимы).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

*O. purpurea* — одно из наиболее изученных растений семейства Orchidaceae как в Крыму (Андропова и др., 2018; Крайнюк, 2021; Шатко и др., 2022), так и в других частях его ареала (Перебора, 2007, 2008; Kosjan *et al.*, 2015; Evans *et al.*, 2020; Popovich *et al.*, 2020; Аверьянова, 2021). В Крыму мониторинговые исследования показали, что популяции, как правило, многочисленны, полночленные, способные к самоподдержанию (Крайнюк, 2021; Шатко и др., 2022). На Кавказе вид распространен по всему Черноморскому побережью Краснодарского края, нередко образуя обширные многочисленные популяции (Popovich *et al.*, 2020). В нарушенных и малонарушенных условиях местообитания вид может существовать длительное время (Перебора, 2007). В Словении было зафиксировано увеличение площади произрастания: из 20 мест нахождения *O. purpurea* 8 было отмечено впервые (Kosjan *et al.*, 2015). Единственная опасность, которая угрожает этому виду, — высокая антропогенная нагрузка на природные экосистемы: расширение жилых районов и интенсификация сельскохозяйственного использования его биотопов. В результате во многих странах, где распространен этот вид, например в Турции, Кипре и Греции, за последние 30 лет количество цветущих растений стремительно сократилось, а многие из их местонахождений уже исчезли (Tsiftsis, Djordjevic, 2018). Наши исследования позволяют объяснить причину широкого распространения и многочисленности данного вида по сравнению с другими представителями этого семейства.

И в степных, и в лесных местообитаниях в популяциях *O. purpurea* были отмечены одинаковые возрастная структура и тип популяций, показатель виталитета, а также морфолого-биологические параметры особей. Различия начинают появляться с увеличением степени затенения. Джакмин с соавт. (Jacquetun *et al.*, 2010a, 2010b) изучили популяции *O. purpurea* в светлых (где  $>25\%$  поступающей солнечной радиации достигало лесной подстилки) и темных (проникновение света в почву  $<1\%$ ) лесных сообществах. Согласно этим исследованиям растения в затененных условиях давали в среднем меньше цветков, уменьшались в размерах, также уменьшалась скорость роста популяций.

Морфологические параметры исследуемого вида могут незначительно отличаться в пределах его ареала. Самые высокие средние значения

морфологических признаков в популяции были отмечены в северо-восточной Греции. Здесь средние значения высоты растений варьировали (в зависимости от местообитания) от 45.22 см до 47.35 см, длина соцветия — от 16.94 см до 17.72 см (Tsiftsis, Djordjevic, 2018). Средние значения морфологических параметров *O. purpurea* в Сочинском Причерноморье примерно соответствовали таковым в Юго-Восточном Крыму: средняя высота генеративного побега составила 42.5 см, длина соцветия — 10.2 см (Аверьянова, 2021). Самые низкие средние значения высоты растений были отмечены в Средиземноморской части Турции, где этот показатель у *O. purpurea* составил 31.6 см (Sevgi *et al.*, 2012).

Иную картину показали популяционные исследования другого близкородственного вида — *O. punctulata* (Letukhova, Potapenko, 2021). Ценопопуляции из лесных и степных сообществ отличались по возрастной и виталитетной структуре, демографическим показателям, морфолого-биологическим параметрам. Согласно Цифцису и Джорджевичу (Tsiftsis, Djordjevic, 2018) особи *O. punctulata* из лесных сообществ имели более крупные соцветия, состоящие из большего количества цветков, в отличие от растений из луговых сообществ. Таких значительных различий в отношении *O. purpurea* обнаружено не было. Таким образом, *O. purpurea*, по сравнению с другим близкородственным видом — *O. punctulata*, обладает более широкой экологической амплитудой, высокой адаптивностью к фитоценоотическим изменениям местообитаний и способен произрастать в широком спектре экологических условий, не меняя своих морфологических и демографических показателей.

Единственное отличие, по которому лесные и степные ценопопуляции *O. purpurea* отличались между собой, — завязываемость плодов. Исследования успешности опыления растений имеют большое значение, поскольку высокий урожай семян может обеспечить долгосрочную жизнеспособность популяции. В лесном сообществе завязываемость плодов оказалась значительно ниже, чем в степном сообществе. Это согласуется с литературными данными. Согласно исследованиям, в Крыму завязываемость плодов *O. purpurea* варьировала от 9% (лес) до 39% (луг) (Андропова и др., 2018; Andronova *et al.*, 2020). В южных районах из-за более высокого разнообразия опылителей и благоприятных климатических условий плодозавязываемость *O. purpurea* может быть выше. Однако и там сохраняется разница в завязываемости плодов у растений из лесных и степных местообитаний (Tsiftsis, Djordjevic, 2018). Более высокий уровень плодоношения в открытых биотопах, очевидно, связан с более значительной ресурсной базой для гнездования и кормления насекомых-опылителей. В результате количество, видовое разнообразие и активность опылителей в этих местообитаниях гораздо выше, и этот факт оказывает влияние на репродуктивный успех и у других представителей семейства Orchidaceae (Шибанова, Долгих, 2011; Аверьянова,

2017; Кириллова, Кириллов, 2018, 2020). Однако даже такой низкий уровень завязываемости плодов, который мы наблюдали в лесных сообществах, достаточен для самоподдержания и развития популяции. Более того, численность *O. purpurea* в Юго-Восточном Крыму гораздо выше в лесных сообществах, чем в степных. Это свидетельствует о том, что у представителей семейства Orchidaceae для процветания популяции более значимую роль играют другие факторы, например доступность микоризных грибов, необходимых для прорастания семян (Фатерыга и др., 2019).

В лесных сообществах нами была обнаружена корреляция плодозавязываемости *O. purpurea* с высотой растения и расстоянием до ближайшего соседа. В ЦП1 с увеличением расстояния между генеративными особями завязываемость плодов уменьшалась, в ЦП2 с увеличением высоты растения было отмечено увеличение завязываемости плодов. Этот факт был установлен и другими исследователями для *O. punctulata*, но не подтвержден для *O. purpurea* (Tsiftsis, Djordjevic, 2018).

Таким образом, несмотря на то что орхидные являются очень уязвимой и плохо приспособленной к условиям окружающей среды группой, *O. purpurea* проявляет способность адаптироваться к разнообразным экологическим факторам. Его популяции способны к самоподдержанию и развитию как в условиях ограниченного количества насекомых-опылителей, так и в условиях жаркого засушливого режима степных биотопов. Тем не менее антропогенный прессинг является для него фактором угрозы. Одним из действенных подходов по сохранению редких видов орхидных является предотвращение гибели или нарушения природных мест обитания путем выделения территорий с заповедным режимом как на государственном, так и на региональном уровне (Демидов, Коломейцева, 2004). Почти все территории в Юго-Восточном Крыму, в которых отмечен *O. purpurea*, имеют тот или иной охранный статус. Горный массив Кизилташ, в котором была обнаружена самая многочисленная популяция этого вида, охранный статуса не имеет. Здесь расположены популяционные маршруты, которые каждый год привлекают тысячи туристов. Мы рекомендуем придать этой территории статус ботанического заказника регионального значения. Это создаст возможность проведения эколого-просветительской деятельности, направленной на воспитание бережного отношения к природе и рациональное использование ее богатств.

## ВЫВОДЫ

Все изученные ценопопуляции *O. purpurea* на территории Юго-Восточного Крыма относятся к категории “молодые” согласно классификации “дельта-омега”. В возрастной структуре лесных ценопопуляций преобладают особи прегенеративного периода, в возрастном спектре степной

ценопопуляции отмечено незначительное преобладание особей генеративного периода. По морфологическим признакам растения, произрастающие в лесных и степных сообществах, достоверно между собой не различаются. Индекс виталитета *O. purpurea* незначительно варьировал в зависимости от условий местообитания и условий вегетационного сезона, индекс пластичности составил 1.30—1.35. Таким образом, *O. purpurea* обладает широким диапазоном устойчивости к среде обитания и может произрастать в сообществах с разной степенью освещенности без изменения своих морфологических, демографических и онтогенетических параметров. Установлено, что в степном сообществе средняя завязываемость плодов равна 39.63 %, в лесном сообществе — 4.97—5.84 %. В лесных сообществах отмечена положительная статистически значимая корреляция ( $r=0.579$ ;  $P=0.006$ ) завязываемости плодов *O. purpurea* с высотой растения и отрицательная статистически значимая корреляция ( $r=-0.496$ ;  $P=0.043$ ) завязываемости плодов *O. purpurea* с расстоянием между особями. Фактором угрозы для этого вида является утрата или деградация мест его обитания под влиянием антропогенной нагрузки, поэтому приоритетными мерами по сохранению *O. purpurea* должно быть ограничение хозяйственной деятельности человека.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках темы гос. задания № 121032300023-7.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аверьянова Е.А. Особенности биологии и распространения *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. (Orchidaceae) в Сочинском Причерноморье (западное Закавказье) // Бюлл. МОИП. Отд. биол. 2017. № 5. С. 65—75.
- Аверьянова Е.А. Биология и распространение *Orchis purpurea* subsp. *caucasica* (Regel) V. Baumann et al. (Orchidaceae Juss.) в Сочинском Причерноморье // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии. 2021. Т. 20. № 1. С. 5—10. DOI 10.14258/pbssm.2021001

- Андропова Е. В., Ковалева А. А., Евдокимова Е. Е., Назаров В. В. Причины низкой жизнеспособности семян *Orchis purpurea* (Orchidaceae) в Крыму // Бот. журн. 2018. Т. 103. № 8. С. 992—1002.
- Демидов А. С., Коломейцева Г. Л. Пути и методы сохранения представителей семейства Orchidaceae Juss. // Интродукция растений. 2004. № 1. С. 13—19.
- Животовский Л. А. Онтогенетические состояния, эффективная плотность и классификация популяций растений // Экология. 2001. № 21. С. 3—7.
- Жукова Л. А. Динамика популяций луговых растений: Автореф. дис. д-ра биол. наук. Новосибирск: ЦСБС РАН, 1987. 32 с.
- Зайцев Г. Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. М.: Наука, 1984. 424 с.
- Ишбирдин А. Р., Ишмуратова М. М. Адаптивный морфогенез и эколого-ценотические стратегии выживания травянистых растений // Методы популяционной биологии. Сыктывкар, 2004. Ч. 2. С. 113—120.
- Кириллова И. А., Кириллов Д. В. Влияние условий освещения на репродуктивный успех *Cypripedium calceolus* L. (Orchidaceae, Liliopsida) // Поволжский экологический журнал. 2018. № 3. С. 259—273. DOI 10.18500/1684-7318-2018-3-259-273
- Кириллова И. А., Кириллов Д. В. Влияние условий освещения на репродуктивный успех *Epipactis helleborine* (L.) Crantz (Orchidaceae) // Экология. 2020. № 4. С. 311—315. DOI 10.31857/S0367059720040095
- Крайнюк Е. С. Мониторинг ценопопуляций *Orchis purpurea* Huds. на особо охраняемой природной территории “Мыс Мартыан” // Наука Юга России. 2021. Т. 17. № 3. С. 62—71. DOI 10.7868/S25000640210308
- Красная книга Республики Крым: растения, водоросли и грибы / Отв. ред. Ена А. В., Фатерыга А. В. Симферополь: ИТ “АРИАЛ”, 2015. 480 с.
- Летухова В. Ю., Потапенко И. Л. Популяционный анализ рода *Ophrys* на территории ботанического заказника Тепе-Оба // Юг России: экология и развитие. 2017. Т. 12. № 4. С. 71—78.
- Миронова Л. П., Фатерыга В. В. Флора Карадагского природного заповедника (сосудистые растения) // 100 лет Карадагской научной станции им. Т. И. Вяземского: сборник научных трудов. Симферополь: Н. Ореанда, 2015. С. 160—204.
- Миронова Л. П., Шатко В. Г. Конспект флоры хребта Эчкидаг в Юго-Восточном Крыму // Бюллетень Главного ботанического сада. 2001. Вып. 182. С. 64—85.
- Миронова Л. П., Шатко В. Г. Конспект флоры хребта Узунсырт и Баракольской котловины в Восточном Крыму // Бюллетень Главного ботанического сада. 2011. Вып. 196. С. 74—101.
- Перебора Е. А. Динамика численности и возрастной структуры популяции *Orchis purpurea* Huds. в условиях Северо-Западного Кавказа // Вест. РУДН. Сер. Экология и безопасность жизнедеятельности. 2007. № 3. С. 49—52.
- Перебора Е. А. Экологические аспекты формирования ценопопуляций *Orchis purpurea* Huds. на Северо-Западном Кавказе // Экол. Вест. Сев. Кавказа. 2008. Т. 4. № 2. С. 59—81.
- Плантариум: открытый онлайн атлас-определитель растений и лишайников России и сопредельных стран. Доступно на <http://www.plantarium.ru> (дата обращения 20.05.2023)
- Уранов А. А. Возрастной состав фитоценопопуляций как функции времени и энергетических волновых процессов // Биол. науки. 1975. № 2. С. 17—29.
- Фатерыга А. В., Ефимов П. Г., Свиринов С. А. Орхидеи Крымского полуострова / Ред. Фатерыга В. В. Симферополь: ИТ “Ариал”, 2019. 224 с.
- Ценопопуляции растений (развитие и взаимоотношения) / Отв. ред. Т. И. Серебрякова. М.: Наука, 1977. 131 с.
- Шатко В. Г., Горбунов Ю. Н., Крючкова В. А. Экологические особенности и мониторинг состояния популяции *Orchis purpurea* Huds. в Юго-Восточном Крыму // Экологические системы и приборы. 2022. № 5. С. 3—14. DOI 10.25791/esip.5.2022.1295
- Шатко В. Г., Миронова Л. П. Конспект флоры полуострова Меганом в Юго-Восточном Крыму // Бюллетень Главного ботанического сада. 2012. Вып. 198. № 1. С. 29—46.
- Шатко В. Г., Миронова Л. П. Конспект флоры хребта Тепе-Оба (Крым) // Бюллетень Главного ботанического сада. 2011. Вып. 197. С. 43—71.
- Шибанова Н. Л., Долгих Я. В. Влияние условий освещения на завязывание плодов у 9 редких видов орхидных Предуралья // Вест. Пермского ун-та. Сер. биол. 2011. № 2. С. 4—6.
- Янцев А. В. Алгоритмы применения статистических критериев. Статистические таблицы и формулы: Уч. пособие для студентов-биологов. Симферополь, 2007. 76 с.
- Andronova E. V., Kovaleva A. A., Evdokimova E. E., Nazarov V. V., Semeonov A. V. Fruitage and seed viability of *Orchis purpurea* (Orchidaceae) at the northeast limit of distribution // The International J. of Plant Reproductive Biology. 2020. 12. № 1. P. 56—66.
- CITES: Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Available at <http://www.cites.org>. (accessed on 25 May 2023)
- Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats. Bern, 1979. 89 p.
- Evans A., Janssens S., Jacquemyn H. Impact of Climate Change on the Distribution of Four Closely Related *Orchis* (Orchidaceae) Species // Diversity. 2020. V. 12. № 8. P. 312. DOI 10.3390/d12080312
- Jacquemyn H., Brys R., Jongejans E. Seed limitation restricts population growth in shaded populations of a perennial woodland orchid // Ecology. 2010a. V. 91. № 1. P. 119—129. DOI 10.1890/08—2321.1
- Jacquemyn H., Brys R., Jongejans E. Size-dependent flowering and costs of reproduction affect population dynamics in a tuberous perennial woodland

- orchid // Journal of Ecology. 2010b. V. 98. № 5. P. 1204—1215. DOI 10.1111/j.1365-2745.2010.01697.x
- Kocjan J., Kačar U., Palka M. Contribution to the knowledge of the distribution of some orchids (Orchidaceae) in Slovenia // Folia biologica et geologica. 2015. V. 56. P. 81—119.
- Letukhova V.Yu., Potapenko I.L. Status and life strategy of *Orchis punctulata* Steven ex Lindl. (Orchidaceae) in the South-Eastern Crimea // Acta Biologica Sibirica. 2021. Iss. 7. P. 407—423. DOI 10.3897/abs.7.e70771
- Popovich A.V., Averyanova E.A., Shagarov L.M. Orchids of the Black Sea coast of Krasnodarsky Krai (Russia): current state, new records, conservation // Nature Conservation Research. 2020. V. 5 (Suppl. 1). P. 46—68. DOI 10.24189/ncr.2020.047
- POWO: Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Available at <http://www.plantsoftheworldonline.org> (accessed 21.04.2023)
- Rankou H. *Orchis purpurea* (Europe assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T175986A7163217 (accessed 25.05.2023) DOI 10.14787/ijprb.2020.12.1
- Sevgi E., Altundag E., Kara Ö., Sevgi O., Tecimen H.B., Bolat İ. Morphological, anatomical and ecological studies on some *Orchis* (Orchidaceae) taxa of Mediterranean region, Turkey // J. Environ. Biol. 2012. V. 33. № 2. P. 343—353.
- Tsiftsis S., Djordjevic V. Habitat effects and differences in the reproductive success of *Orchis punctulata* and *Orchis purpurea* (Orchidaceae) // Turk. J. Bot. 2018. V. 42. № 4. P. 400—411. DOI 10.3906/bot-1711-22.

## Impact of growing conditions on vegetation, development and reproductive success of *Orchis purpurea* Huds. in the South-Eastern Crimea

© 2024 V. Yu. Letukhova\*, #, I. L. Potapenko\*

\*T. I. Vyazemsky Karadag Scientific Station — Nature Reserve of RAS,  
Nauki str., 24, Kurortnoye, Feodosia, 298188 Russia

#E-mail: [letukhova@gmail.com](mailto:letukhova@gmail.com)

The individual and population parameters of lady orchis — *Orchis purpurea* Huds. (Orchidaceae) under different growing conditions are compared. The ontogenetic type of cenopopulations, age, efficiency, recovery indices, vitality of individuals, plasticity index are determined. The largest number of plants is noted in forest communities. Demographical and morphological parameters differ nonsignificantly. Slight fluctuations in the vitality of individuals are noted depending on the habitat and the conditions of the growing season. The pollination success of plants in steppe biotopes is much higher than that in forest biotopes: the average fruit set in steppe biotopes was 39.63 %, in forest biotopes — 4.97—5.84 %. However, it did not affect reproductive success, the main indicator of which is the presence of new generations of plants: in all studied cenopopulations, a high proportion of individuals of the pregenerative period was noted. It is established that *O. purpurea* has a wide ecological amplitude and high adaptability to various conditions. It can grow in different habitats without changing morphological, demographic and ontogenetic parameters.

**Key words:** *Orchis purpurea* Huds., Crimea, demographic parameters, morphological features, vitality, pollination success.

УДК 630\*181.36:631.11:711.14(470.22)

## ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ КОРНЕВЫХ СИСТЕМ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД В ПОСТАГРАРНЫХ ФИТОЦЕНОЗАХ

© 2024 г. А. Ю. Карпечко\*, А. В. Туюнен\*, Н. В. Геникова\*, И. А. Дубровина\*\*,  
М. В. Медведева\*, Е. В. Мошкина\*, А. В. Мамай\*

\*Институт леса — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185910 Россия

\*\*Институт биологии — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения  
науки Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185910 Россия

@E-mail: [anna.karpechko@gmail.com](mailto:anna.karpechko@gmail.com)

Поступила в редакцию 24.05.2023

После доработки 08.09.2023

Принята к публикации 19.09.2023

В статье рассматривается масса тонких (диаметром до 2 мм) корней древесных пород и особенности их распределения по почвенному профилю в постагрогенных лесных сообществах среднетаежной подзоны Республики Карелия. Характеристики лесных участков определялись на пробных площадях, заложенных по стандартным методикам. Для определения массы корней отбирались почвенные монолиты. Получено, что молодые сообщества развивают большую массу тонких корней по сравнению с древостоями старших возрастов. Общая корненасыщенность верхнего минерального слоя почвы выше по сравнению с лесной подстилкой. В большинстве случаев корни и хвойных и лиственных древесных пород преобладают в этом почвенном слое. Была выявлена связь массы тонких корней с суммой площадей сечений.

**Ключевые слова:** сельхозземли, залежь, восстановительная сукцессия, масса тонких корней, корневая конкуренция.

**DOI:** 10.31857/S1026347024030118, **EDN:** UZVOUG

Корневая система играет ключевую роль в жизнедеятельности растений. Она выполняет механическую роль, являясь опорой дереву; снабжает растение водой и элементами минерального питания (Pregitzer, 2002; Brunner, Godbold, 2007). Недолговечность тонких корней и в связи с этим их быстрый оборот обеспечивают большой вклад биомассы, содержащей углерод и минеральные вещества, в почву (Brunner, Godbold, 2007).

Конкурентные взаимоотношения между древесными породами определяют модель размещения корней по почвенной толще, сказываются на распределении питательных веществ, влияя, таким образом, на продуктивность насаждений (Schmid, 2002; Brassard *et al.*, 2013; Шанин и др., 2015; Mekontchou *et al.*, 2020). Совместное произрастание нескольких пород может приводить к угнетению корней одной из них (Schmid, 2002). В то же время древостои с несколькими породами в составе более производительны по сравнению с чистыми (Kelty, 1992; Шанин и др., 2015; Mekontchou *et al.*, 2020). С одной стороны, это связывается с тем, что в смешанных древостоях эффективнее используется солнечная радиация (Sterba *et al.*, 2002). Однако отмечается и влияние

по разным нишам, что снижает конкуренцию за элементы минерального питания (Brassard *et al.*, 2011; Шанин и др., 2015; Mekontchou *et al.*, 2020). Процесс разложения листового опада может ускорять круговорот питательных веществ, обуславливая сохранение или увеличение продуктивности древостоя (Légaré *et al.*, 2005). Видовые особенности ольхи, часто представленной в постаграрных лесных сообществах, способствуют улучшению химических свойств почвы (Nikodemus *et al.*, 2020), в том числе благодаря ее способности к фиксации атмосферного азота (Дегтева, Ипатов, 1987; Aosaar *et al.*, 2013).

Согласно работам (Schmid, 2002; Brassard *et al.*, 2013; Шанин и др., 2015) для смешанных древостоев характерна большая масса корней по сравнению с чистыми. Размещение корней в почве и их масса зависят от видовой принадлежности древесных пород, которые произрастают вместе (Шанин и др., 2015; Mekontchou *et al.*, 2020). Авторами (Шанин и др., 2015; Bolte, Villanueva, 2006; Mekontchou *et al.*, 2020) при проведении исследований в смешанных сообществах лесной зоны были выявлены видоспецифичные особенности вертикального распределения корней растений по профилю почвы. Если корни разных пород приурочены к одним

почвенным горизонтам, это приводит к конкуренции и снижению подземной биомассы (Kallioikoski, 2011). Совместное произрастание разных древесных пород в одном местообитании и проистекающие из этого взаимоотношения вызывают интерес у многих исследователей, что подчеркивает актуальность темы. В то же время многообразие и варьирование почвенных условий, вероятно, оказывают влияние на отношения между древесными породами, поэтому изучение особенностей их произрастания в разных экологических условиях остается актуальным.

Известно, что почвенные характеристики оказывают прямое влияние на массу тонких корней лесных сообществ: более плодородные почвы в меньшей степени насыщены корнями по сравнению с менее плодородными (Helmisaari *et al.*, 2007, 2009; Karpetchko *et al.*, 2022). Кислотность почвы также может отражаться на корненасыщенности почвы: на кислых почвах масса корней уменьшается из-за снижения микробиологической активности, с увеличением рН почв масса тонких корней возрастает (Haunes, 1982; Francis, 1986; Leuschner, Hertel, 2003; Helmisaari *et al.*, 2009; Lawrence *et al.*, 2012). В то же время были получены данные, согласно которым внутри древостоя тонкие корни распределяются по объему почвы неравномерно, стремясь занять пространства, где содержится больше элементов минерального питания, на что влияет в том числе фитогенное поле дерева (Карпечко и др., 2022).

Связь характеристик подземной части древостоя с его таксационными показателями вызывает интерес у многих исследователей. Влияние возраста древостоя на массу тонких корней рассмотрено в работах (Vanninen, Mäkelä, 1999; Võrja *et al.*, 2008; Yuan, Chen, 2010; Jagodzinski, Kałucka, 2011). С изменением возраста древостоя могут меняться его потребности в элементах минерального питания, что сказывается и на массе тонких корней. Согласно некоторым работам, масса корней возрастает до определенного возраста и далее снижается. В работе (Jagodzinski, Kałucka, 2011) приводятся данные, согласно которым наибольший прирост биомассы тонких корней наблюдается в древостоях в возрасте между 6 и 10 годами и до 47 лет остается примерно на одинаковом уровне. Yuan, Chen (2010) показали, что в хвойных древостоях, как правило, увеличение биомассы тонких корней идет до 90 лет, а затем она снижается. Есть ряд работ, указывающих на связь массы тонких корней с базальной площадью (Helmisaari *et al.*, 2007; Lehtonen *et al.*, 2016). В работах (Helmisaari *et al.*, 2007; Karpetchko *et al.*, 2022) масса тонких корней связывается с массой листвы.

Леса, возобновляющиеся на постаграрных землях, являются эффективным поглотителем углерода. Согласно работам (Третьяков и др., 2017; Грибов и др., 2020; Vrubaker, Cosentino, 2020) эти сообщества высокопродуктивные, с почвами, богатыми элементами минерального питания. В настоящее время в связи с важностью углеродной повестки и необходимостью

выполнения обязательств Парижского соглашения, в том числе с имеющимися перспективами учета углероддепонирующих свойств лесов на бывших аграрных землях, изучение особенностей роста и развития спонтанно восстанавливающихся лесов весьма актуально. Ранее в работе (Карпечко и др., 2021) авторы изложили результаты, полученные при изучении специфики распределения в почве тонких корней древесных растений и динамики их массы в лесных фитоценозах, находящихся в условиях постагрогенной трансформации среды. Расширенные данные, приведенные в настоящей статье, получены на большем количестве участков на разных почвах. Они уточняют и дополняют сведения о динамике тонких корней как компонента, активно участвующего в цикле углерода в почвах лесных сообществ. Это необходимо для более точной оценки потоков углерода и лучшего понимания роли постагрогенных экосистем в глобальных климатических процессах. Таким образом, целью работы были анализ массы корней и изучение особенностей распределения корней древесных пород в верхнем почвенном слое в древостоях естественного происхождения, спонтанно восстановившихся и развивающихся на вышедших из сельхозиспользования землях.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в среднетаежной подзоне Республики Карелия, для которой характерен континентальный климат с чертами морского (Научно-прикладной..., 1988). Среднегодовая температура воздуха по многолетним наблюдениям составляет около +2.5 °С, средняя температура января –9 °С, июля +17 °С. Сумма осадков по многолетним исследованиям составляет 578–618 мм в год (Назарова, 2014, 2015).

Пробные площади (ПП) закладывались в районах, где имеются вышедшие из сельхозиспользования участки с различной давностью забрасывания, с восстановившимся к настоящему времени лесным покровом. Таким образом, были отобраны районы, располагающиеся в окрестностях Петрозаводска (ПП 1a, 1b, 1c) на подзолистых почвах (Retisols), в южном Сямозерье (вблизи н/п Эссойла) (ПП 2a, 2b, 2c) на альфегумусовых почвах (Podzols) и на Заонежском полуострове (вблизи н/п Толвуя) на органо-аккумулятивных почвах (Umbrisols) (ПП 3a, 3b, 3c) (рис. 1). При наличии, для предварительного отбора участков использовались имеющиеся фондовые и архивные материалы, ретроспективно характеризующие аграрное освоение территории (аэрофото- и спутниковые снимки, межевые планы и др.).

Измерения параметров деревьев проводились на ПП прямоугольной формы, для разбивки границ которых на местности использовались мерная лента и оптический теодолит УОМЗ Т30 или буссоль Suunto KB-14. Закладка ПП выполнялась в соответствии с ОСТ 56-69-83 «Площади пробные лесоустroительные.

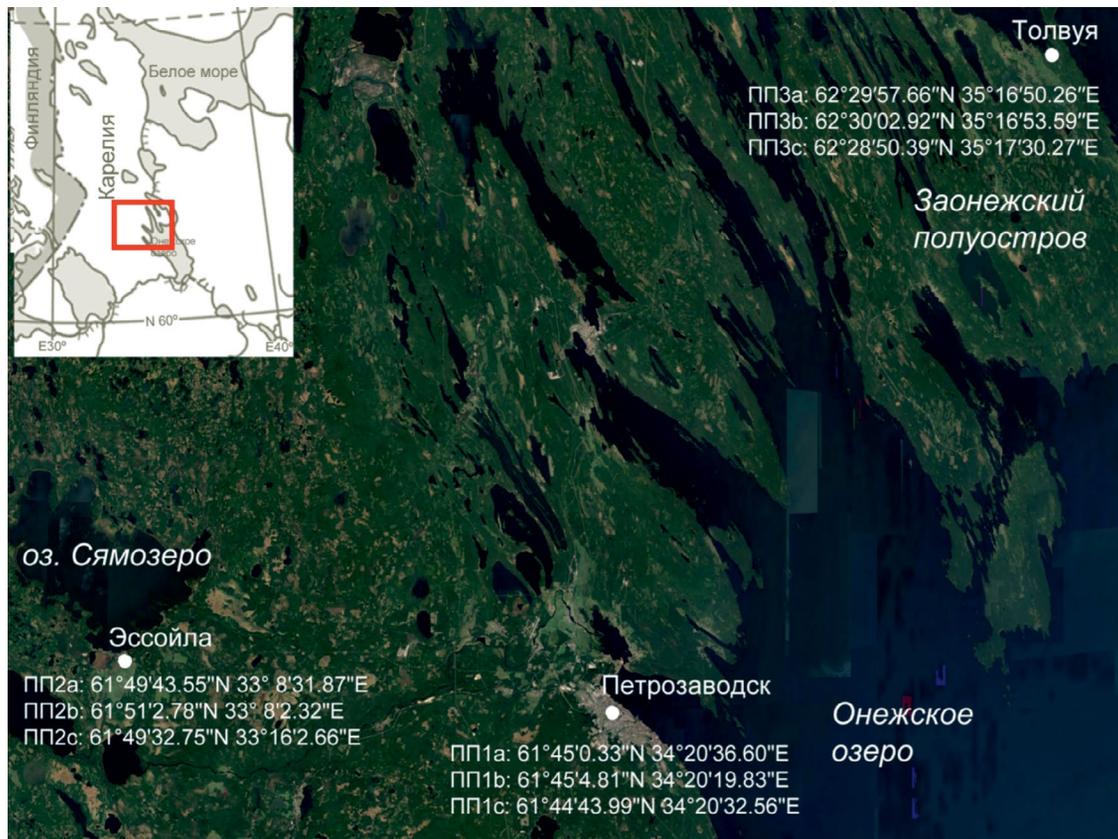


Рис. 1. Расположение района исследований и пробных площадей.

Методы закладки». С использованием мерной вилки Haglof Mantax Black в пределах пробной площади производилось измерение диаметров на высоте груди живых деревьев и сухостоя по породам по 2-сантиметровым ступеням толщины (для древостоев 65—130 лет). Высота деревьев измерялась лазерным высотомером-дальномером LTI TruPulse 200 в каждой ступени толщины. Для определения возраста из области корневой шейки с использованием возрастного бурава отбирались керны диаметром 5 мм. В лабораторных условиях выполнялся пересчет годичных колец.

В молодых древостоях (15—20 лет) в пределах выделенной пробной площади случайным образом закладывались круговые площадки (площадь 10 м<sup>2</sup>, радиус 1.78 м). Число площадок определялось с таким расчетом, чтобы их общая площадь составляла 15% от площади пробы. На круговых площадках измерялись диаметры живых деревьев и сухостоя по породам на высоте груди по 1-сантиметровым ступеням толщины, а также высоты деревьев в каждой ступени толщины. Так же как в древостоях старших возрастов, определялся возраст. Таксационная характеристика участков приведена в табл. 1.

На каждой ПП выполнялись геоботанические описания с оценкой общего проективного покрытия напочвенного покрова, проективного покрытия травяно-кустарничкового, мохово-лишайникового

ярусов, опада и каждого вида растений. Названия видов сосудистых растений приведены по Конспекту флоры Карелии (Кравченко, 2007), названия видов мохообразных — по работе Ignatov *et al.*, 2006.

Для морфологического описания почв и определения их классификационной принадлежности (Шишов и др., 2004; Anjos *et al.*, 2015) на ПП закладывали полнопрофильные разрезы. Из верхних минеральных горизонтов извлекались образцы для последующих анализов. В почвенных образцах определяли обменную кислотность (рН<sub>KCl</sub>) потенциометрически; содержание органического углерода (С<sub>орг</sub>) методом высокотемпературного каталитического сжигания; содержание общего азота (N<sub>общ</sub>) по Кьельдалю; содержание подвижного фосфора (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) и калия (K<sub>2</sub>O) по Кирсанову. В табл. 2 указаны показатели почвенного плодородия.

Массу тонких корней определяли методом монолитов. На ПП отбиралось до 15 монолитов, размер которых составлял 10x10x20 см. Из образцов извлекались корни древесных пород диаметром до 2 мм. Затем корни были разделены на 2 группы: корни хвойных и лиственных пород. Корни отделялись от почвы, промывались, высушивались до абсолютно сухого состояния при температуре 105 °С и взвешивались на аналитических весах ОНАУS PX224. Общая подземная биомасса определялась с использованием конверсионных коэффициентов, характеризующих известные соотношения между

Таблица 1. Таксационная характеристика древостоев

ПП	Площадь, га	Возраст, лет	Древесная порода	Запас, м <sup>3</sup> /га	Число стволов на 1 га	Средний диаметр, см	Средняя высота, м	Сумма площадей сечений, м <sup>2</sup> /га	Класс бонитета
<b>ПЕТРОЗАВОДСК</b>									
1a	0.1	20	Ива	77	11167	4.4	6.4	16.6	I
			Береза	56.1	8750	3.9	8.1	10.2	
			Ольха	15.6	667	7.7	8.9	3.05	
1b	0.1	65	Ель	193	1444	14.6	13.9	24.1	II
			Ольха	37.7	222	17.6	14.8	5.42	
			Осина	29.2	44	31.4	18.3	3.44	
			Береза	15.6	44	23.7	17.2	1.96	
			Рябина	9.3	267	8.6	10.4	1.6	
1c	0.28	110	Ель	459	575	28.5	27.3	36.8	II
			Береза	17.5	71	17.3	23.3	1.69	
			Осина	3.27	4	31.9	25.0	0.29	
<b>ЮЖНОЕ СЯМОЗЕРЬЕ</b>									
2a	0.2	15	Ольха	154.7	6400	7.3	10.4	26.5	I
			Береза	21.2	2200	4.8	8.1	3.92	
			Ива	7.5	2700	2.7	5.7	1.52	
			Сосна	0.5	20	3.0	3.8	0.16	
2b	0.1	65	Сосна	143.3	250	26.5	21.0	13.8	II
			Ольха	51.1	1510	8.9	8.0	9.42	
			Рябина	41.7	870	9.5	8.4	6.2	
2c	0.23	130	Сосна	230.3	738	21.0	17.9	25.6	IV
			Ель	59.5	1155	8.8	9.8	7.04	
			Береза	19.8	307	10.3	12.6	2.54	
<b>ЗАОНЕЖСКИЙ ПОЛУОСТРОВ</b>									
3a	0.1	17	Ольха	63.1	6333	5.2	7.7	13.6	I
			Сосна	49.3	2833	7.1	7.0	11.2	
			Береза	6.5	1417	3.4	7.0	1.3	
			Ель	1.2	250	4.2	4.0	0.4	
			Ива	0.2	500	1.4	2.0	0.1	
3b	0.3	70	Сосна	205.3	420	25.2	21.6	21.0	II
			Ель	39.1	97	22.8	19.5	3.9	
			Береза	10.8	43	18.7	20.6	1.2	
			Рябина	2.5	203	5.8	8.4	0.5	
			Ольха	1	10	13.0	9.9	0.13	
3c	0.28	70	Сосна	280	692	24.2	18.1	31.8	III

запасом стволовой древесины/надземной биомассы/подземной биомассы. Использовались данные, приведенные в (Казимиров, Морозова, 1973; Казимиров и др., 1979; Зябченко, 1984). При выборе конверсионных коэффициентов учитывались породный состав, тип леса и возраст лесных сообществ.

Древостои ПП 1a, 2a, 3a представляют собой молодые (15–20 лет) смешанные мелколиственные (1a, 2a)

и лиственно-хвойное (3a) сообщества. Показатель общего проективного покрытия напочвенного покрова в молодых сообществах составляет 20–40%. Доминантами являются злаки и виды разнотравья. Всего на пробных площадях молодых сообществ отмечено от 21 до 35 видов сосудистых растений. Моховой покров слабо развит и имеет проективное покрытие до 10%. На ПП 1a агродерново-подзолистая почва

Таблица 2. Показатели почвенного плодородия в верхних минеральных горизонтах почв ( $n = 6$ )

ПП	Почва	Горизонт, глубина, см	pH <sub>KCl</sub>	N <sub>общ</sub> , %	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , мг/кг	K <sub>2</sub> O, мг/кг	C <sub>орг</sub> , %
<b>ПЕТРОЗАВОДСК</b>							
1a	Агродерново-подзолистая типичная	P, 5—15	4.05±0.06*	0.26±0.01	103.0±4.0	44.5±4.5	3.08±0.18
1b	Дерново-подзолистая постагрогенная	AУ, 5—15	3.67±0.08	0.29±0.03	14.0±1.2	39.8±6.5	4.56±0.48
1c	Подзолистая типичная	EL, 6—16	3.23±0.01	0.09±0.01	3.5±0.01	13.3±0.5	2.16±0.02
<b>ЮЖНОЕ СЯМОЗЕРЬЕ</b>							
2a	Агрозем альфегумусовый иллювиально-железистый	P, 5—15	4.90±0.11	0.13±0.01	1478.8±33.9	216.3±6.2	1.78±0.17
2b	Дерново-подбур оподзоленный	AУ, 7—17	3.89±0.06	0.17±0.01	144.5±8.4	17.3±1.2	3.88±0.38
2c	Подзол иллювиально-железистый	E, 7—12	3.43±0.03	0.03±0.01	14.5±3.2	10.8±0.9	0.79±0.06
<b>ЗАОНЕЖСКИЙ ПОЛУОСТРОВ</b>							
3a	Литозем серогумусовый темнопрофильный	AУ, 4—14	5.61±0.20	0.18±0.02	14.5±2.1	179.1±28.4	1.59±0.18
3b	Серогумусовая темнопрофильная постагрогенная	AУ, 5—15	5.66±0.11	0.44±0.07	14.5±1.2	293.1±35.3	6.28±1.01
3c	Серогумусовая темнопрофильная	AУ, 10—20	3.74±0.16	0.43±0.07	34.3±1.0	84.4±4.1	6.41±0.98

Примечание. Приведены средние значения ± ошибка среднего.

претерпевает частичную постагрогенную трансформацию профиля, в верхней части текстурного горизонта наблюдается возобновление элювиально-иллювиального процесса. В напочвенном покрове преобладают *Calamagrostis phragmitoides* С. Hartm. (30%) и *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. (5%). На ПП 2a в результате агрогенной трансформации типичного подзола сформирован агрозем альфегумусовый иллювиально-железистый. Доминантами травяно-кустарничкового яруса являются *Calamagrostis arundinacea* (L.) Roth, *Dactylis glomerata* L. и *Orthilia secunda* (L.) House). ПП 3a (как и все участки серии 3) представлена азональной почвой, развитой на шунгитовой морене и элювии шунгитовых сланцев. Она не подвергалась значительному освоению и диагностирована как литозем серогумусовый темнопрофильный. В напочвенном покрове доминируют *Deschampsia cespitosa* (L.) P. Beauv., *Fragaria vesca* L. ПП 1b, 2b, 3b — это постагрогенные древостои возрастом 65—70 лет, где преобладающее положение по запасу стволовой древесины принадлежит хвойным породам. В составе сообществ представлены также лиственные породы (ольха, береза, рябина). ПП 1b заложена на дерново-подзолистой постагрогенной почве, которая близка к зональным аналогам, имеет отчетливо выраженный элювиальный горизонт и постагрогенную трансформацию серогумусового горизонта. Для данной ПП характерна высокая

сомкнутость древесного полога и, следовательно, слабое развитие напочвенного покрова (общее проективное покрытие 20%), покрытие опада достигает 95%. В напочвенном покрове преобладают *Oxalis acetosella* L. (15%) и *Dryopteris carthusiana* (Vill.) H. P. Fuchs (10%). На ПП 2b представлен дерново-подбур оподзоленный с признаками постагрогенной трансформации профиля в виде преобразования агрогумусового горизонта в серогумусовый и оподзоливания его в нижней части. Здесь напочвенный покров состоит преимущественно из *Vaccinium myrtillus* L. (25%), *Avenella flexuosa* (L.) Drejer (20%), *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum* (Desv.) Underw. ex A. Heller (20%) и *D. carthusiana* (15%). Моховой покров практически отсутствует (1%). На ПП 3b представлена серогумусовая темнопрофильная почва с незначительными признаками постагрогенной трансформации. Доминантами травяно-кустарничкового яруса являлись *D. glomerata* (20%), *Rubus idaeus* L. (15%), *Geranium sylvaticum* L. (10%). Покрытие мохового покрова составляло 30% (*Rhytidiadelphus triquetrus* (Hedw.) Warnst., *Hylocomium splendens* (Hedw.) Bruch et al., *Pleurozium schreberi* (Willd. ex Brid.) Mitt.). ПП 1c, 2c, 3c — это участки, которые не вовлекались в прошлом в многолетнее сельхозпроизводство. ПП 1c, 2c заложены в сообществах возрастом 110, 130 лет соответственно, 3c представлена 70-летним сообществом. 70-летний возраст ПП 3c связан с тем, что изученная

часть Заонежского полуострова чрезвычайно интенсивно осваивалась, таким образом лесных участков на автоморфных почвах с более высоким возрастом в ходе обследования не найдено. На ПП 1с развита типичная подзолистая почва с текстурной дифференциацией профиля. Напочвенный покров на ПП 1с отличается высоким проективным покрытием *V. myrtillus* (40%) и *O. acetosella* (15%). В моховом ярусе преобладают *P. schreberi* (20%) и *Sphagnum girgensohnii* Russow (15%). ПП 2с представлена зональной почвой — подзолом иллювиально-железистым. В составе напочвенного покрова ПП 2с обнаружено всего 5 видов сосудистых растений, из которых преобладают *V. myrtillus* и *Vaccinium vitis-idaea* L. Проективное покрытие травяно-кустарничкового яруса составляет 60%, мохово-лишайниковое — 80%. ПП 3с заложена на серогумусовой темнопрофильной почве. Доминантами напочвенного покрова являются *V. myrtillus* (25%), *Convallaria majalis* L. (15%), *Avenella flexuosa* (15%). Мохово-лишайниковый ярус отсутствует.

Статистическая обработка результатов выполнялась в программе Statsoft Statistica. Сравнение групп на значимость различий проводилось с использованием методов непараметрической статистики (критерии Манна—Уитни и Краскелла—Уоллиса).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Масса тонких корней

Масса тонких корней в древостоях разных возрастов статистически достоверно отличается (табл. 3) (участки в окрестностях Петрозаводска ( $p=0.0032$ ), в южном Сямозерье ( $p=0.0004$ )). В молодых сообществах, расположенных в окрестностях Петрозаводска и южном Сямозерье, масса тонких корней выше, чем в древостоях старших возрастов. Значимая разница

в массе тонких корней наблюдается между молодыми и средневозрастными древостоями. Так, на ПП 1а и 2а масса тонких древесных корней больше, чем на ПП 1б и 2б на 45%. В то же время анализ показал, что на участках, заложенных на Заонежском полуострове (ПП 3а, 3б, 3с), разница в массе корней незначима ( $p=0.1514$ ).

Доля тонких корней от общей подземной фитомассы в молодых сообществах (1а, 2а и 3а) колеблется в достаточно широком диапазоне и составляет 25.5, 16.5 и 9.0% соответственно (табл. 3). Полученные значения доли тонких корней в молодняках превышают значения этого показателя в старших сообществах.

При разделении тонких корней на хвойные и лиственные получено, что в 17-летнем древостое (ПП 3а) масса тонких корней лиственных пород больше по сравнению с хвойными ( $p=0.03$ ) (рис. 2).

В 65—70-летних сообществах, несмотря на преобладание по запасу хвойных пород над лиственными, масса тонких корней лиственных пород больше. Для ПП 1б разница составляет 41% ( $p=0.01$ ). Для ПП 2б и ПП 3б тенденция остается, однако различия между значениями незначимы (рис. 3).

В древостоях 1с и 2с с возрастом 110, 130 лет соответственно тенденция меняется на обратную: большую массу развивают корни хвойных пород, преобладающих по запасу стволовой древесины (различия статистически значимы) (рис. 4).

### Распределение тонких корней по горизонтам

Анализ распределения корней по слоям почвы в древостоях 1а и 2а (возраст 20, 15 лет) выполнить не представлялось возможным вследствие недифференцированности почвенного профиля. В других древостоях в большинстве случаев тонких корней хвойных пород больше в минеральном слое почвы по сравнению с лесной подстилкой (табл. 4). В ельнике 110 лет (ПП 1с) корни хвойных преобладают

Таблица 3. Масса и доля тонких корней древесных пород в верхнем слое почвы

ПП	Общая подземная фитомасса, т/га	Корни диаметром до 2 мм	
		масса, т/га	% от общей подземной фитомассы
ПЕТРОЗАВОДСК			
1а	12.60	3.21±0.37 <sup>а*</sup>	25.5
1б	31.28	1.78±0.17 <sup>б</sup>	5.7
1с	59.40	2.59±0.21 <sup>а</sup>	4.3
ЮЖНОЕ СЯМОЗЕРЬЕ			
2а	15.08	2.49±0.32 <sup>а</sup>	16.5
2б	27.24	1.39±0.19 <sup>б</sup>	5.1
2с	31.60	2.72±0.20 <sup>а</sup>	8.6
ЗАОНЕЖСКИЙ ПОЛУОСТРОВ			
3а	13.16	1.19±0.17 <sup>а</sup>	9.0
3б	25.40	1.18±0.16 <sup>а</sup>	4.6
3с	22.24	0.81±0.13 <sup>а</sup>	3.6

Примечание. Разными буквами показаны статистически значимые различия ( $p < 0.05$ ).

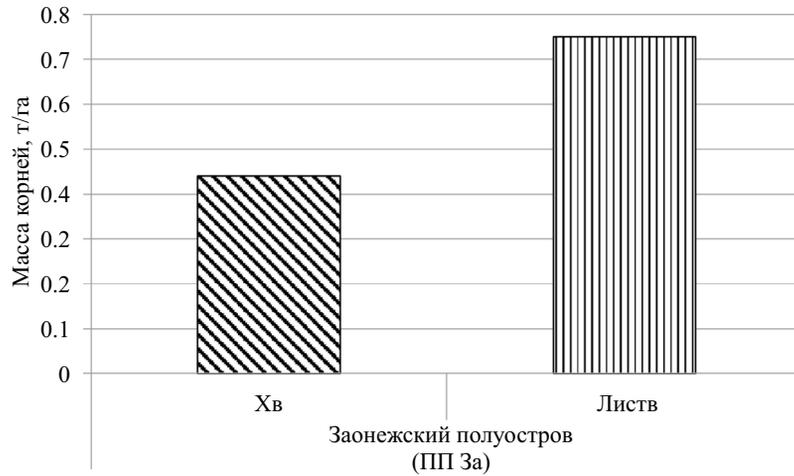


Рис. 2. Масса тонких корней по породам в 17-летнем древостое ПП 3а.

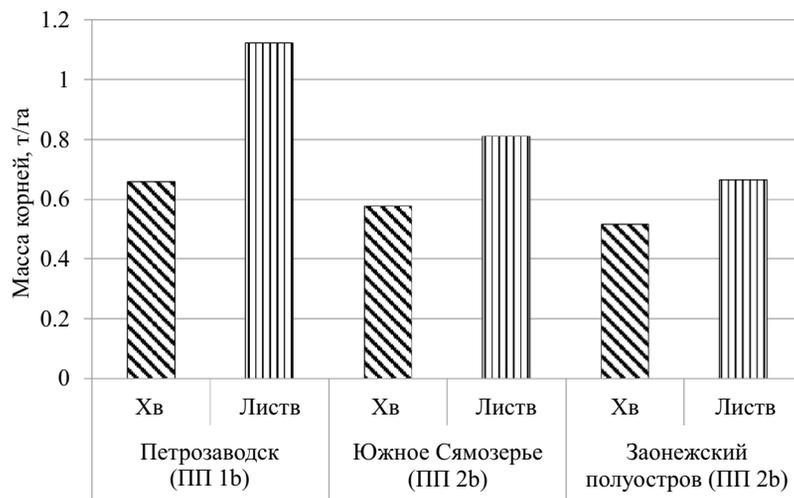


Рис. 3. Масса тонких корней по породам в древостоях 65–70 лет.

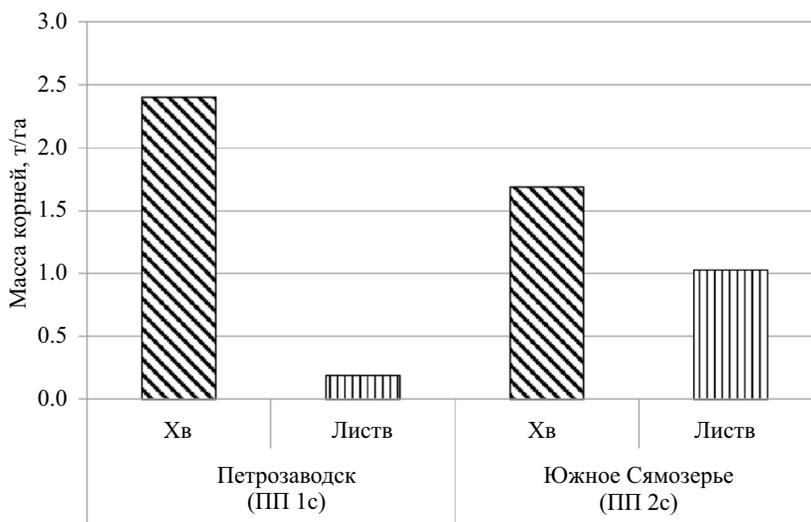


Рис. 4. Масса тонких корней по породам в контрольных древостоях (110 и 130 лет).

Таблица 4. Масса тонких корней по слоям почвы, т/га

ПП	Масса корней хвойных пород		Масса корней лиственных пород	
	Лесная подстилка	Минеральный слой почвы	Лесная подстилка	Минеральный слой почвы
3а	0.11±0.03 <sup>а*</sup>	0.34±0.12 <sup>б</sup>	0.37±0.1 <sup>а</sup>	0.37±0.08 <sup>а</sup>
1б	0.21±0.06 <sup>а</sup>	0.44±0.07 <sup>б</sup>	0.42±0.06 <sup>а</sup>	0.71±0.14 <sup>а</sup>
2б	0.14±0.03 <sup>а</sup>	0.44±0.11 <sup>б</sup>	0.25±0.05 <sup>а</sup>	0.56±0.13 <sup>а</sup>
3б	0.11±0.04 <sup>а</sup>	0.41±0.12 <sup>б</sup>	0.23±0.10 <sup>а</sup>	0.43±0.18 <sup>а</sup>
1с	1.32±0.16 <sup>а</sup>	1.08±0.14 <sup>а</sup>	0.03±0.01 <sup>а</sup>	0.16±0.03 <sup>б</sup>
2с	0.64±0.1 <sup>а</sup>	1.05±0.13 <sup>а</sup>	0.50±0.08 <sup>а</sup>	0.53±0.09 <sup>а</sup>
3с	0.11±0.03 <sup>а</sup>	0.70±0.13 <sup>б</sup>	-**	-

Примечание. \* — разными буквами показаны статистически значимые различия ( $p < 0.05$ ); \*\* — корни лиственных пород отсутствуют.

в лесной подстилке, однако различие здесь незначимо. Корни лиственных пород также в большей степени находятся в минеральном слое почвы. Однако различия значимы только на ПП 1с.

#### Связь тонких корней и надземной части древостоя

При изучении связи подземной части древостоя с надземной рассматривали, будет ли изменяться

масса тонких корней с увеличением суммы площадей сечений. Была получена тенденция увеличения массы корней с ростом суммы площадей сечений (рис. 5). Следует отметить, что для лиственных пород коэффициент детерминации значительно выше (0.82), чем для хвойных (0.50). В то же время в связи с ограниченным набором данных зависимость носит предварительный характер.

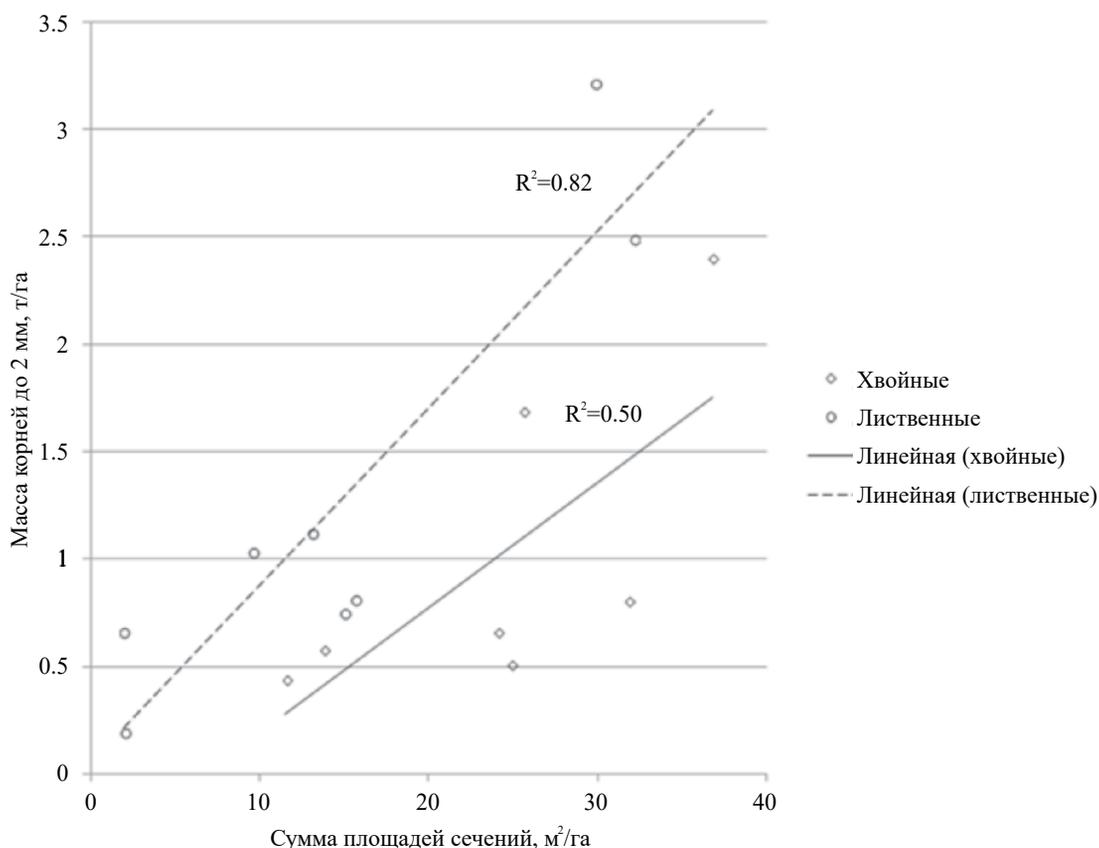


Рис. 5. Связь суммы площадей сечений с массой тонких корней.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обычно постагрогенные леса рассматриваются как высокопроизводительные (Третьяков и др., 2017; Грибов и др., 2020; Brubaker, Cosentino, 2020). Характеристики постаграрных древостоев в изучаемых условиях, близких к северной границе земледелия, отличаются от не затронутых сельхозиспользованием и являются нетипичными для зональных лесных сообществ. Ключевыми различиями выступают видовой состав лесных сообществ и их производительность. Лиственные древесные породы, входящие в состав древостоев (включая рябину и иву козью, что не характерно для бореальных лесов), могут рассматриваться как эдификатор, так как оказывают влияние на условия среды, при этом являясь также успешным конкурентом за свет и питательные вещества для хвойных пород при совместном произрастании.

Высокая масса тонких корней в молодых сообществах, которая обсуждалась ранее авторами в работе (Карпечко и др., 2021), подтверждается расширенным собранным материалом. В молодых сообществах активно аккумулируется фитомасса, показатели почвенного плодородия в данных древостоях также отличаются от сообществ старших возрастов. В то же время на участках Заонежского полуострова (ПП 3а, 3б, 3с) разница в массе тонких корней между участками незначительна. ПП 3а заложена в древостое, где почва представлена сильнокаменистым мелкопрофильным литоземом. Данный факт, по видимому, ограничивает развитие корневой системы здесь. Также отсутствие различий в массе корней может объясняться более слабым последствием агрогенной трансформации почвы на пробной площади 3а, связанной с менее интенсивным использованием участка в сельхозпроизводстве (внесением меньшего количества органических удобрений или использованием в качестве луга, сенокоса).

Доля тонких корней в общей массе корней в молодых сообществах, как правило, выше, чем в старших сообществах (табл. 3). Такая закономерность связана с тем, что молодые древостои активно аккумулируют фитомассу. Для этого требуется большое количество элементов минерального питания, содержание которых в почве достаточно велико (табл. 2), что является следствием сельхозиспользования участка. Это стимулирует активный рост и развитие тонких корней здесь.

Для начальных стадий зарастания древесными породами (после смыкания крон) характерна высокая внутри- и межвидовая конкуренция (Lagocque *et al.*, 2012) за элементы минерального питания, что, в свою очередь, также способствует развитию высокой массы тонких корней (Wang *et al.*, 2002). Кроме того, корни лиственных пород, в том числе березы, ольхи, которые входят в состав молодых сообществ, обладают большей энергией роста по сравнению с хвойными породами (Дегтева, Ипатов, 1987; Зарубина, Коновалов, 2014). Доминирование тонких

корней лиственных пород в 65–70-летних древостоях, несмотря на преобладание по запасу хвойных пород над лиственными, также доказывает большую скорость роста корней лиственных пород по сравнению с хвойными и более высокую конкурентоспособность корней лиственных пород (Schmid, 2002).

Следствием конкуренции являются интенсивное изреживание и элиминация отдельных пород из состава древостоя. Наличие на ПП 2а сухостоя и небольшого количества живых экземпляров сосны, которые приурочены исключительно к опушечной части, подтверждает это. Деревья сосны, находящиеся внутри лиственного массива, отстали в росте и погибли, не выдержав конкуренции за свет с лиственными породами, которые обладают более высокой скоростью роста, особенно ольха (Дегтева, Ипатов, 1987).

Размещение большей массы тонких корней древесных пород в одной почвенной нише, в нашем случае в верхнем минеральном слое почвы (табл. 4), указывает на конкурентные отношения между подземными органами древостоя. Для корней всех древесных пород в изучаемых условиях верхний минеральный слой почвы является более благоприятным местом для роста. Однако в большинстве случаев разница между массой корней лиственных пород в верхнем минеральном слое почвы и лесной подстилке незначительна (табл. 4). Таким образом, корни лиственных пород, являясь более конкурентоспособными (Schmid, 2002; Зарубина, Коновалов, 2014), активнее занимают весь изучаемый слой почвы. В то же время наблюдается тенденция насыщения корнями в большей степени верхнего минерального слоя почвы по сравнению с подстилкой. В литературе встречается много данных о том, что корни каждой отдельной породы занимают свою, определенную нишу (Bolte, Villanueva, 2006; Шанин и др., 2015; Mekontchou *et al.*, 2020). В работе (Mekontchou *et al.*, 2020) указывается на то, что осина при совместном произрастании с елью создает последние благоприятные условия, улучшая почву, тем самым корневая конкуренция снижается. В наших условиях почвы характеризуются достаточно ограниченным объемом благоприятного для роста и развития корневых систем слоя почвы, что обуславливает активное освоение корнями древесных пород этой экологической ниши и высокую напряженность корневой конкуренции. Данная закономерность уже отмечалась в предыдущих работах (Карпечко, 2007).

Рост подземной части древостоя связан с надземной. В работе (Lehtonen *et al.*, 2016) указывается на тесную связь массы тонких корней с суммой площадей сечений для лесных сообществ, произрастающих на не затронутых сельскохозяйственным производством в прошлом землях. Полученные данные подтвердили эту связь для постаграрных лесных участков. Однако в то же время существуют исследования, где отмечалось отсутствие статистически значимой зависимости между количеством

тонких корней и суммой площадей сечений древостоя (Карпечко, 2009; Sun *et al.*, 2015). Таким образом, таксационные характеристики лесного сообщества, безусловно, оказывают влияние на массу тонких корней, но, по-видимому, это влияние в некоторой степени уникально для каждого древостоя и отчасти обусловлено условиями произрастания. С учетом ограниченного набора данных для анализа полученные зависимости носят предварительный характер и нуждаются в дальнейшем изучении.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Постаграрные лесные сообщества отличаются от зональных по комплексу показателей. Ключевыми отличиями для надземной части древостоев являются породный состав и производительность древостоев, произрастающих на бывших сельхозземлях.

Исследования показали, что в молодых сообществах (15–20 лет) масса тонких корней больше по сравнению с сообществами старших возрастов (65–70 лет). Это связано с тем, что в молодняках идет наиболее активный рост и накопление фитомассы. В случае совместного произрастания на начальных этапах восстановительной сукцессии листовенные породы имеют преимущество над хвойными, являясь сильным конкурентом за элементы минерального питания и свет. Рост и развитие подземной части древостоя связан с надземной: масса тонких корней увеличивается с ростом суммы площадей сечений.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (Институт леса КарНЦ РАН, Институт биологии КарНЦ РАН).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Грибов С.Е., Корчагов С.А., Хамитов Р.С., Евдокимов И.В. Производительность древостоев, сформировавшихся на землях сельскохозяйственного назначения // Лесной вестник. 2020.

Т. 24, № 6. С. 19–25. <https://doi.org/10.18698/2542-1468-2020-6-19-25>

- Дегтева С.В., Ипатов В.С. Сероольшаники Северо-запада РСФСР. Л.: ЛГУ, 1987. 252 с.
- Зарубина Л.В., Коновалов В.Н. Эколого-физиологические особенности ели в березняках черничных. Архангельск: САФУ, 2014. 378 с.
- Зябченко С.С. Сосновые леса Европейского Севера. Л.: Наука, 1984. 244 с.
- Казимиров Н.И., Морозова Р.М. Биологический круговорот веществ в ельниках Карелии. Л.: Наука, 1973. 175 с.
- Казимиров Н.И., Морозова Р.М., Куликова В.К. Органическая масса и потоки веществ в березняках средней тайги. Л.: Наука, 1979. 216 с.
- Карпечко А.Ю. Особенности формирования корней в еловых и смешанных насаждениях после рубок ухода в Южной Карелии // Актуальные проблемы лесного комплекса: Сб. научных трудов по итогам международной научно-технической конференции. Вып. 17. Брянск: БГИТА, 2007. С. 160–163.
- Карпечко А.Ю. Влияние разреживания на корнотенность почвы еловых древостоев Южной Карелии // Изв. ВУЗов. Лесн. журн. 2009. № 3. С. 19–25.
- Карпечко А.Ю., Туюнен А.В., Медведева М.В., Мошкина Е.В., Дубровина И.А., Геникова Н.В., Сидорова В.А., Мамай А.В., Толстогузов О.В., Кулакова Л.М. Масса тонких корней в почвах лесных сообществ на постагрозенных землях в условиях средней тайги (на примере Республики Карелия) // Растительные ресурсы. 2021. Т. 57. № 2. С. 145–157. <https://doi.org/10.31857/S0033994621010088>
- Карпечко А.Ю., Мошкина Е.В., Медведева М.В., Туюнен А.В. Особенности пространственного распределения тонких корней *Pinus sylvestris* L. (на примере среднетаежного сосняка брусничного) // Сибирский экологический журнал. 2022. Т. 29. № 2. С. 162–175. <https://doi.org/10.15372/SEJ20220204>
- Кравченко А.В. Конспект флоры Карелии. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2007. 403 с.
- Назарова Л.Е. Изменчивость средних многолетних значений температуры воздуха в Карелии // Известия Русского географического общества. 2014. Т. 146. № 4. С. 27–33.
- Назарова Л.Е. Атмосферные осадки в Карелии // Труды Карельского научного центра РАН. 2015. № 9. 114–120. <https://doi.org/10.17076/lim56>
- Научно-прикладной справочник по климату СССР. Серия 3. Многолетние данные. Вып. 3. Л.: Гидрометеиздат, 1988. 693 с.
- Третьяков С.В., Коптев С.В., Богданов А.П., Ильинцев А.С., Демиденко С.А., Тимофеева А.В. Лесотаксационные нормативы для определения объемов стволов ольхи серой *Alnus incana* L. по разрядам высот // Сибирский лесной журнал. 2017. № 3. С. 81–86. <https://doi.org/10.15372/SJFS20170308>

- Шанин В.Н., Рочева Л.К., Шашков М.П., Иванова Н.В., Москаленко С.В., Бурнашева Э.Р. Особенности пространственного распределения биомассы корней некоторых древесных видов (*Picea abies*, *Pinus sylvestris*, *Betula* sp.) // Изв. РАН. Сер. биол. 2015. № 3. С. 316—325. <https://doi.org/10.7868/S000233291503011X>
- Шишов Л.Л., Тонконогов В.Д., Лебедева И.И., Герасимова М.И. Классификация и диагностика почв России. Смоленск: Ойкумена, 2004. 342 с.
- Anjos L., Gaistardo C., Deckers J., Dondeyne S., Eberhardt E., Gerasimova M., Harms B., Jones A., Krasilnikov P., Reinsch T., Vargas R., Zhang G., authors. Schad P., Van Huyssteen C., Micheli E., editors. World reference base for soil resources 2014 International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. Rome: FAO, 2015. JRC91947
- Aosaar J., Varik M., Lõhmus K., Ostonen I., Becker H., Uri V. Long-term study of above- and below-ground biomass production in relation to nitrogen and carbon accumulation dynamics in a grey alder (*Alnus incana* (L.) Moench) plantation on former agricultural land // Eur. J. For. Res. 2013. V. 132. P. 737—749. <https://doi.org/10.1007/s10342-013-0706-1>
- Bolte A., Villanueva I. Interspecific competition impacts on the morphology and distribution of fine roots in European beech (*Fagus sylvatica* L.) and Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) // Eur. J. For. Res. 2006. V. 125. P. 15—26. <https://doi.org/10.1007/s10342-005-0075-5>
- Børja I., De Wit H.A., Steffenrem A., Majdi H. Stand age and fine root biomass, distribution and morphology in a Norway spruce chronosequence in southeast Norway // Tree Physiol. 2008. V. 28. P. 773—784. <https://doi.org/10.1093/treephys/28.5.773>
- Brassard B.W., Chen Han Y.H., Bergeron Y., Pare D. Differences in fine root productivity between mixed- and single-species stands // Funct. Ecol. 2011. V. 25. P. 238—246. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01769.x>
- Brassard B.W., Chen H.Y.H., Cavard X., Laganière J., Reich P.B., Bergeron Y., Paré D., Yuan Z. Tree species diversity increases fine root productivity through increased soil volume filling // J. Ecol. 2013. V. 101. P. 210—219. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12023>
- Brubaker K., Cosentino B. Forest structure and biomass in post-agricultural forests: Lessons learned with new spatial tools // Appl. Veg. Sci. 2020. 24: e12552. <https://doi.org/10.1111/avsc.12552>
- Brunner I., Godbold D. Tree roots in a changing world // J. For. Res. 2007. V. 12. P. 78—82. <https://doi.org/10.1007/s10310-006-0261-4>
- Francis A.G. The ecological effects of acid deposition. II. acid-rain effects on soil and aquatic microbial processes // Experientia. 1986. V. 42. P. 455—465. <https://doi.org/10.1007/BF01946683>
- Haynes R.J. Effects of liming on phosphate availability in acid soils — a critical review // Plant Soil. 1982. V. 68. P. 289—308. <https://doi.org/10.1007/BF02197935>
- Helmisaari H.S., Derome J., Nöjd P., Kukkola M. Fine root biomass in relation to site and stand characteristics in Norway spruce and Scots pine stands // Tree Physiol. 2007. V. 27. P. 1493—1504. <https://doi.org/10.1093/treephys/27.10.1493>
- Helmisaari H.S., Saarsalmi A., Kukkola M. Effects of wood ash and nitrogen fertilization on fine root biomass and soil and foliage nutrients in a Norway spruce stand in Finland // Plant Soil. 2009. V. 314. P. 121—132. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9711-4>
- Ignatov M.S., Afonina O.M., Ignatova E.A. Check-list of mosses of East Europe and North Asia // Arctoa. 2006. V. 15. P. 1—130. <https://doi.org/10.15298/arctoa.15.01>
- Jagodzinski A.M., Katucka I. Fine root biomass and morphology in an age-sequence of post-agricultural *Pinus sylvestris* L. stands // Dendrobiology. 2011. V. 66. P. 71—84.
- Kalliokoski T. Root system traits of Norway spruce, Scots pine, and silver birch in mixed boreal forests: an analysis of root architecture, morphology, and anatomy. Dissertationes Forestales. 2011. V. 121. P. 1—67.
- Karpechko Y., Karpechko A., Tuyunen A. The effect of growth conditions on the relationship between fine root and foliage biomass // J. For. Res. 2022. V. 33. P. 1585—1591. <https://doi.org/10.1007/s11676-021-01444-3>
- Kelty M.J. Comparative productivity of monocultures and mixed-species stands. In: Kelty MJ, Larson BC, Oliver CD (eds) The ecology and silviculture of mixed-species forests. Kluwer, Dordrecht, 1992. P. 125—141.
- Larocque G.R., Luckai N., Adhikary S.N., Groot A., Bell F.W., Sharma M. Competition theory — science and application in mixed forest stands: review of experimental and modelling methods and suggestions for future research // Environ. Rev. 2012. V. 21(2). P. 71—84. <https://doi.org/10.1139/er-2012-0033>
- Lawrence D.J., Luckai N., Meyer W.L., Shahi C., Fazekas A.J., Kesanakurti P., Newmaster S. Distribution of white spruce lateral fine roots as affected by the presence of trembling aspen: root mapping using simple sequence repeat DNA profiling // Can. J. For. Res. 2012. V. 42(8). P. 1566—1576. <https://doi.org/10.1139/x2012-082>
- Légaré S., Paré D., Bergeron Y. Influence of Aspen on Forest Floor Properties in Black Spruce-dominated Stands // Plant Soil. 2005. V. 275. P. 207—220. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-1482-6>
- Lehtonen A., Palviainen M., Ojanen P., Kalliokoski T., Nöjd P., Kukkola M., Penttilä T., Mäkipää R., Leppälampi-Kujan-suu J., Helmisaari H.S. Modelling fine root biomass of boreal tree stands using site and stand variables // For. Ecol. Manag. 2016. V. 359. P. 361—369. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.06.023>
- Leuschner C., Hertel D. Fine root biomass of temperate forests in relation to soil acidity and fertility, climate, age and species. In: Progress in Botany. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 2003. P. 405—438. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-55819-1\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55819-1_16)

- Mekontchou C.G., Houle D., Bergeron Y., Drobyshev I.* Contrasting Root System Structure and Belowground Interactions between Black Spruce and Trembling Aspen in Boreal Mixed woods of Eastern Canada // *Forests*. 2020. V. 11(2): 127. <https://doi.org/10.3390/f11020127>
- Nikodemus O., Kaupe D., Kukuš I., Brūmelis G., Kasparskis R., Dauškane I., Treimane A.* Effects of afforestation of agricultural land with grey alder (*Alnus incana* (L.) Moench) on soil chemical properties, comparing two contrasting soil groups // *For. Ecosyst.* 2020. V. 7(1): 38. <https://doi.org/10.1186/s40663-020-00253-0>
- Pregitzer K.S.* Fine roots of trees — a new perspective // *New Phytol.* 2002. V. 154. P. 267—270. [https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00413\\_1.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00413_1.x)
- Schmid I.* The influence of soil type and interspecific competition on the fine root system of Norway spruce and European beech // *Basic Appl. Ecol.* 2002. V. 3(4). P. 339—346. <https://doi.org/10.1078/1439-1791-00116>
- Sterba H., Blab A., Katzensteiner K.* Adapting an individual tree growth model for Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) in pure and mixed species stands // *For. Ecol. Manag.* 2002. V. 59. P. 101—110. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(01\)00713-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00713-7)
- Sun T., Dong L. L., Mao Z. J., Li Y. Y.* Fine root dynamics of trees and understory vegetation in a chronosequence of *Betula platyphylla* stands // *For. Ecol. Manag.* 2015. V. 346. P. 1—9. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.02.035>
- Vanninen P., Mäkelä A.* Fine root biomass of Scots pine stands differing in age and soil fertility in southern Finland // *Tree Physiol.* 1999. V. 19. P. 823—830. <https://doi.org/10.1093/treephys/19.12.823>
- Wang X. L., Klinka K., Chen H. Y. H., de Montigny L.* Root structure of western hemlock and western red cedar in single- and mixed-species stands // *Can. J. For. Res.* 2002. V. 32(6). P. 997—1004. <https://doi.org/10.1139/x02-026>
- Yuan Z. Y., Chen Y. H.* Fine root biomass, production, turnover rates, and nutrient contents in boreal forest ecosystems in relation to species, climate, fertility, and stand age: literature review and meta-analyses // *Crit. Rev. Plant Sci.* 2010. V. 29. P. 204—221. <https://doi.org/10.1080/07352689.2010.483579>

## Peculiarities of tree root system development in post-agricultural forest communities

© 2024 A. Karpechko\*, #, A. Tuyenen\*, N. Genikova\*, I. Dubrovina\*\*, M. Medvedeva\*, E. Moshkina\*, A. Mamai\*

\*Forest Research Institute of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., Petrozavodsk, Karelia, 185910 Russia

\*\*Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., Petrozavodsk, Karelia, 185910 Russia

#E-mail: [anna.karpechko@gmail.com](mailto:anna.karpechko@gmail.com)

The article studies the mass of fine (up to 2 mm in diameter) roots of woody species and the patterns of their distribution across the soil profile in post-agricultural forest communities in the middle taiga of Karelia, Russia. Forest site characteristics were determined in sampling plots established following conventional procedures. The root mass was determined by the soil monolith method. Analysis showed that young communities developed a greater mass of fine roots compared to older stands. The total root occupation of the top mineral layer of soil was higher than in the forest floor. In most cases, both coniferous and deciduous roots prevailed in mineral soil layer. The relationship between fine root mass and basal area was identified.

*Keywords:* agricultural land, fallow, secondary succession, fine root biomass, root competition.

## ИЗОТОПНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ КОЛЛАГЕНА КОСТЕЙ БЕЛОСПИННЫХ АЛЬБАТРОСОВ (*PHOEBASTRIA ALBATRUS*) В РАЙОНЕ БЕРИНГОВА МОРЯ В ГОЛОЦЕНЕ

© 2024 г. О. А. Крылович\*<sup>@</sup>, С. В. Самсонов\*, Е. А. Кузьмичева\*, А. Б. Савинецкий\*

\*ИПЭЭ РАН им. А.Н. Северцова, Ленинский пр., 33, Москва, 119071 Россия

@ Email: okrylovich@gmail.com

Поступила в редакцию 11.12.2023

После доработки 25.12.2023

Принята к публикации 25.12.2023

Белоспинный альбатрос (*Phoebastria albatrus*) – редкий в наши дни вид птиц, чья численность в голоцене значительно снизилась из-за промысловой деятельности человека. Костные остатки альбатросов из археологических памятников Чукотки, Камчатки и Алеутских о-вов, и из береговых отложений Командорских о-вов были использованы для анализа содержания стабильных изотопов углерода и азота в коллагене костей. Результаты анализа показали, что в голоцене происходила дифференциация изотопных ниш алеутских и командорских альбатросов. Белоспинные альбатросы Алеутских о-вов по изотопным характеристикам ближе к голоценовым альбатросам о. Ванкувер (Канада).

**Ключевые слова:** Белоспинный альбатрос, *Phoebastria albatrus*, Алеутские о-ва, Командорские о-ва, Берингово море, изотопная ниша, стабильные изотопы,  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ .

**DOI:** 10.31857/S1026347024030129, **EDN:** UZULQM

Белоспинный альбатрос (*Phoebastria albatrus*) в недавнем прошлом был одним из самых многочисленных видов птиц в Северной Пацифике. На протяжении голоцена белоспинные альбатросы использовали для питания океаническую и шельфовую зоны всей северной части Тихого Океана до Берингова пролива на севере. Это известно благодаря многочисленным находкам костей данного вида в прибрежных археологических памятниках Японии, о. Сахалин, Курильских и Алеутских о-вов, Чукотки, о. Св. Лаврентия, тихоокеанского побережья Северной Америки до Калифорнии (Dinesman *et al.*, 1999; Causey *et al.*, 2005; Guiry *et al.*, 2022). В настоящее время белоспинный альбатрос – крайне редкий вид мировой авифауны. Основной причиной сокращения численности считается промысел на немногочисленных гнездовых колониях (всего несколько островов в Восточно-Китайском море) в XIX веке. В 1886 году в Японии была организована фирма, занимающаяся сбором перьев и пуха альбатросов. В течение 15 лет, до 1902 года, на островах, где гнездились эти птицы, было добыто до 5 миллионов экземпляров (Красная книга, 1983). К началу 1940-х гг., после нескольких извержений вулканов в местах гнездования, этот вид считался вымершим (Brooke, 2004). Однако птицы, оставшиеся в море, стали возвращаться на острова и в последнее время благодаря охранным мероприятиям численность белоспинных альбатросов постепенно растет и исчисляется несколькими сотнями особей (Шунтов, 1982; Carboneras *et al.*, 2020).

Из-за невысокой численности и охранного статуса многие вопросы экологии этого вида остаются малоизученными. При этом питание этого вида птиц во время длительных миграций все еще плохо изучено. Немногочисленные данные известны по птицам, погибшим в рыболовных сетях, самыми многочисленными объектами питания которых были кальмары разных видов (Walker *et al.*, 2015). Использование методов спутникового слежения позволило выяснить, что современные белоспинные альбатросы с возрастом начинают отдавать предпочтение определенным районам океана и каждый год возвращаются в одни и те же места (Orben *et al.*, 2018).

Насколько этот выбор может быть постоянным на протяжении многих поколений в масштабах тысячелетий, помогли выяснить исследования с использованием метода анализа содержания стабильных изотопов углерода и азота. Многочисленные костные остатки белоспинных альбатросов из археологических памятников побережья Северной Пацифики стали основой для такого рода исследований (Guiry *et al.*, 2022). Изотопный метод основан на том, что изотопный состав тканей консумента зависит от изотопного состава его диеты (DeNiro and Epstein, 1978, 1981). Особенности содержания тяжелого изотопа углерода ( $\delta^{13}\text{C}$ ) в тканях организма являются косвенной характеристикой района питания животного в случае морских экосистем (Hobson *et al.*, 1997; Burton, Koch, 1999). Содержание тяжелого изотопа азота ( $\delta^{15}\text{N}$ ) в тканях является

показателем трофического положения животного и в случае морских экосистем, так же, как и с  $\delta^{13}\text{C}$ , — косвенной характеристикой региона питания (DeNiro, Epstein, 1978, 1981; Minagawa, Wada, 1984; Sigman *et al.*, 2009). Большой набор процессов, регулирующих источники и круговорот углерода и азота в водной среде, приводит к пространственно-временным изменениям изотопного фона биогенных элементов и первичной продукции (Sigman *et al.*, 2009; Guiry, 2019). Это служит основой для отслеживания перемещения животных между изотопно различающимися регионами. Факторы, определяющие изотопный состав первичных продуцентов в океане, включают температуру поверхности моря, концентрацию  $\text{CO}_2$ , продуктивность и лимитирование питательных веществ, физиологию и скорость роста фитопланктона, распространенность азотфиксации или денитрификации, а также океанические течения, вызывающие перемешивание между регионами с различными изотопными характеристиками (Rau *et al.*, 1989; Sigman *et al.*, 2009). Эти переменные ответственны за создание широких региональных изотопных различий между пищевыми сетями на всем ареале белоспинных альбатросов. Благодаря этому группы особей, которые постоянно кормятся в определенных регионах, отличающихся друг от друга изотопными характеристиками, имеют характерные изотопные ниши.

Коллаген кости крупных животных содержит усредненный изотопный сигнал диеты за несколько последних лет жизни, что позволяет использовать этот показатель как усредненную характеристику питания/мест обитания за относительно долгий период времени (Hobson, Clark, 1992; Hedges *et al.*, 2007). Изотопные исследования археологических белоспинных альбатросов показали, что на протяжении долгого времени (тысячи лет) часть птиц выбирала для кормления одни и те же участки Тихого океана. Птицы, добытые древними охотниками, например, у берегов Калифорнии (США), в среднем значительно отличались по изотопному составу от птиц, добытых у берегов о. Ванкувер (Британская Колумбия, Канада) или Курильских о-вов (Eda *et al.*, 2012; Vokhshoori *et al.*, 2019; Guiry *et al.*, 2022). В целом изотопный состав альбатросов обусловлен изотопным составом первичной продукции регионов, в которых кормились альбатросы (Vokhshoori *et al.*, 2019).

Цель нашей работы — определить расположение в изотопном пространстве изотопных ниш белоспинных альбатросов из археозоологического материала Алеутских и Командорских о-вов, Чукотки и Камчатки, так как для этих районов подобной информации не было известно ранее. Мы предполагаем, что альбатросы Алеутских и Командорских о-вов использовали на протяжении голоцена для питания одну акваторию и их изотопные ниши будут сильно перекрываться, а изотопный состав будет схожим. При этом наиболее схожими по расположению в изотопном пространстве алеутские и командорские альбатросы будут с альбатросами о. Ванкувер.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для нашей работы мы использовали кости белоспинных альбатросов из археологических памятников Алеутских островов из восточной (о. Уналашка), центральной (о. Адак и Четырехсопочные о-ва) и западной (о. Булдырь и о. Шемья) частей гряды, береговых отложений Командорских о-вов (о. Беринга) и археологических памятников Камчатки и Чукотки (табл. 1, рис. 1). Материал был собран в разное время при участии сотрудников Лаборатории исторической экологии ИПЭЭ РАН. Кости из археологического памятника Жупаново (Камчатка) были выбраны из коллекции костей птиц, переданных Е. Н. Курочкиным (ПИН РАН) для определения А. Б. Савинецкому.

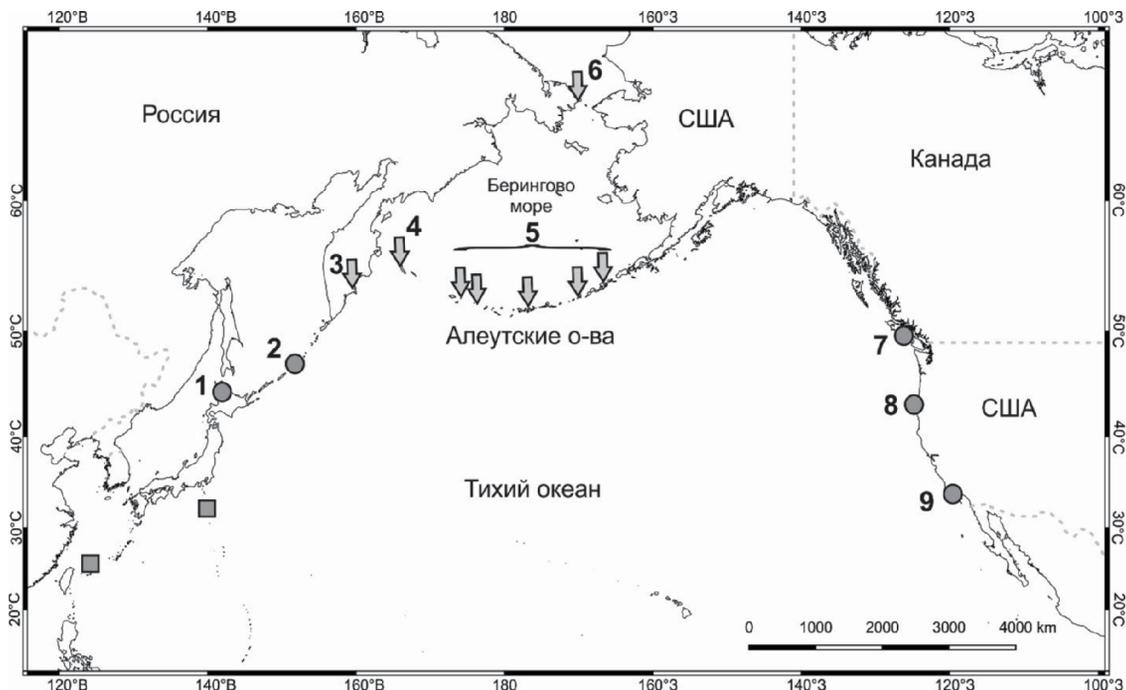
Периоды происхождения материала из археологических памятников определены по разбросу радиоуглеродных дат из литературных источников (табл. 1). Период существования памятника UNL-061 на о. Уналашка определен по одной радиоуглеродной дате (NUTA2—26991,  $2777 \pm 40$  радиоуглеродных лет назад) с использованием калибровочной кривой IntCal20 в программе OxCal v4.4.4 (Reimer *et al.*, 2020; Ramsey, 2023). Кости белоспинных альбатросов о. Беринга были собраны в дюнных береговых отложениях. Мы делаем допущение, что эти кости относятся к периоду не позднее XIX века, так как позже численность белоспинных альбатросов резко снизилась и вероятность сохранения остатков птиц в береговых отложениях очень мала.

Для анализа мы выбирали все возможные кости с надежными определительными признаками, так как в предыдущих работах было показано, что в случае белоспинных альбатросов элемент скелета не влияет на изотопный сигнал (Guiry *et al.*, 2022). Так как кости альбатросов достаточно редки в археологическом материале (хоть и встречаются регулярно), мы делаем допущение, что вероятность попадания костей от одной особи в наш материал очень мала.

Отбор материала и выделение коллагена были проведены в Лаборатории исторической экологии ИПЭЭ РАН.

Для анализа содержания стабильных изотопов углерода и азота в коллагене костей для каждого образца было отобрано около 0.5 г костной ткани. Коллаген выделяли по модифицированному методу Лонжина (Longin, 1971; Jørgkov *et al.*, 2007; Горлова и др., 2015; Szpak *et al.*, 2017). Вкратце, обработка заключалась в деминерализации костей 1М соляной кислотой, очисткой от органических загрязнений 0.125М раствором NaOH и желатинизации при 70 °С. Далее 300—500 мкг сухого коллагена было использовано для анализа, который проводился в ЦКП “Инструментальные методы в экологии” ИПЭЭ РАН с использованием масс-спектрометра ThermoFinnigan Delta V Plus, сопряженного с элементным анализатором (Thermo Flash 1112)

Соотношение стабильных изотопов ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) представлено в тысячных долях ( $\delta$ , ‰)



**Рис. 1.** Карта района исследований — Северная часть Тихого океана. Квадратами отмечены современные гнездовые колонии белоспинных альбатросов, кругами — районы, для которых известна изотопная изменчивость коллагена костей белоспинных альбатросов из археологических памятников побережья Северной Пацифики по литературным данным (Eda *et al.*, 2012; Vokhshoori *et al.*, 2019; Guiry *et al.*, 2022), стрелками — районы с нашими данными по изотопной изменчивости коллагена костей голоценовых белоспинных альбатросов. Регионы: 1 — о. Ребун (Япония), 2 — Курильские о-ва (РФ), 3 — Камчатка (РФ), 4 — Командорские о-ва (РФ), 5 — Алеутские о-ва (США), 6 — Чукотка (РФ), 7 — о. Ванкувер (Канада), 8 — Орегон (США), 9 — Калифорния (США).

**Таблица 1.** Места и периоды происхождения костей белоспинных альбатросов, использованных для изотопного анализа

Географический район	Археологический памятник/отложение	Период (лет назад)	Штуки
Алеутские о-ва			
о. Уналашка	UNL-061	2900—2700	26
о. Чугинадак	Tanaġ Agunaġ Site Unit 1	2800—2000 <sup>(1)</sup>	2
о. Карлайл	Ulyagan Site Unit 4	2900—1850 <sup>(1)</sup>	4
	Ulyagan Site Unit 5	~400 <sup>(1)</sup>	1
о. Адак	ADK-171	~6700 <sup>(2)</sup>	2
	ADK-012	~1850—1500 <sup>(3)</sup>	3
	ADK-011	~400—170 <sup>(3)</sup>	10
о. Булдырь	KIS-008	650—100 <sup>(4)</sup>	1
о. Шемья	ATU-061	2700—2000 <sup>(4)</sup>	17
	ATU-023	3000—100 <sup>(4)</sup>	3
Командорские о-ва			
о. Беринга	Дюны рядом с с. Никольское	До XIX века	12
Камчатка	Жупаново	2000—300 <sup>(5)</sup>	5
Чукотка	Канискак	~1300—800 <sup>(6)</sup>	3

Примечание. Данные о периодах по: <sup>1</sup>Krylovich *et al.*, 2019; <sup>2</sup>Savinetsky *et al.*, 2012; <sup>3</sup>Crockford 2012; <sup>4</sup>Lefèvre *et al.*, 2010; <sup>5</sup>Брайцева и др., 1983; <sup>6</sup>Khasanov *et al.*, 2022.

отклонения от международных стандартов (VPDB для  $\delta^{13}\text{C}$  и атмосферный азот для  $\delta^{15}\text{N}$ ). Аналитическая погрешность определения изотопного состава (SD при анализе лабораторного стандарта,  $n = 6-8$ ) не превышала 0.2‰.

Вместе с определением изотопного состава в пробе определяли общее содержание углерода и азота (% C, % N) и атомарное соотношение C/N, которые служат индикаторами сохранности белка в древних образцах (DeNiro, 1985, Guiry, Szpak, 2021).

Для сравнения изотопной изменчивости белоспинных альбатросов в пределах северной части Тихого океана мы использовали данные по изотопной изменчивости коллагена костей белоспинных альбатросов из археологических памятников о. Ребун (Япония), Курильских о-вов (Россия), Орегона (США), Калифорнии (США) (Eda *et al.*, 2012; Vokhshoori *et al.*, 2019) и о. Ванкувер (Канада) (Guiry *et al.*, 2022).

Для обнаружения различий между значениями  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$  коллагена костей белоспинных альбатросов между регионами сразу по двум изотопам мы использовали непараметрический пермутационный многомерный дисперсионный анализ (PERMANOVA), который используется для сравнения групп объектов и проверки нулевой гипотезы о том, что центроиды и дисперсия групп, определенных пространством мер, эквивалентны для всех групп (Anderson, 2014) с последующим многоуровневым попарным сравнением. Для этого были использованы функции adonis2 пакета “vegan” и пакет “pairwiseAdonis” в программной среде R (Oksanen *et al.*, 2019; R Core Team, 2020; Martinez Arbizu, 2020).

Далее для обнаружения различий по каждому из изотопов мы использовали однофакторный дисперсионный анализ Краскела — Уоллиса (критерий Краскела—Уоллиса) с последующим попарным сравнением (критерий Уилкоксона с поправкой Бенджамина—Хохберга, (Benjamini, Hochberg, 1995)) в программной среде R.

Для сравнения/характеристики размера изотопных ниш альбатросов из разных регионов мы используем площади стандартных изотопных эллипсов, ограничивающих около 40 % выборки (Jackson *et al.*, 2011). Определение площадей стандартных изотопных эллипсов, с поправкой на малый размер выборки (SEAc) и площадь их перекрытия (в %), проведено в пакете “SIBER” среды R (Jackson *et al.*, 2011).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего были получены результаты по содержанию стабильных изотопов азота и углерода в коллагене 89 костей белоспинных альбатросов (табл. 2).

Соотношение содержания общего углерода к азоту (C: N) в коллагене кости является показателем сохранности и незагрязненности коллагена посторонним углеродом (например, гуминовыми кислотами) (DeNiro, 1985). Для костей альбатросов в нашем случае этот показатель  $3.26 \pm 0.03$  (среднее и стандартное отклонение, максимальное — 3.31, минимальное — 3.19), что соответствует хорошей сохранности и допустимым примесям постороннего углерода (Guiry, Szpak, 2021).

Сравнение изотопных подписей альбатросов из разных частей Алеутской островной дуги не выявило значимых различий, поэтому мы объединили результаты для всей островной дуги в одну выборку.

Мы приводим результаты статистических тестов для результатов изотопного анализа альбатросов из археологических памятников Чукотки и Камчатки, но не будем использовать эти результаты в нашем анализе, так как результаты для малых выборок (5 образцов для Камчатки и 3 для Чукотки) считаем ненадежными.

Сравнение по двум изотопам всех регионов Северной Пацифики показало наличие достоверных отличий (PERMANOVA,  $F = 16.786$ ,  $p > 0.001$ ). Дальнейшие попарные сравнения показали, что белоспинные альбатросы Алеутских о-вов в среднем значимо

**Таблица 2.** Результаты определения содержания стабильных изотопов азота и углерода в коллагене костей белоспинных альбатросов Алеутских и Командорских островов, Камчатки и Чукотки из голоценовых отложений

Остров/группа островов/район	N	$\delta^{13}\text{C}$ M $\pm$ SD	$\delta^{15}\text{N}$ M $\pm$ SD	SEAc
о. Уналашка (восток)	26	-14.4 $\pm$ 0.6	18.3 $\pm$ 0.8	
Четырехсopочные о-ва (центр)	7	-14.4 $\pm$ 0.6	17.8 $\pm$ 0.7	
о. Адак (центр)	15	-14.1 $\pm$ 0.4	18.1 $\pm$ 1	
о. Булдырь и Шемья (запад)	21	-14.4 $\pm$ 0.6	17.7 $\pm$ 1	
Алеутские о-ва (все)	69	-14.4 $\pm$ 0.5	18 $\pm$ 0.9	1.32
о. Беринга Командорские о-ва	12	-14.5 $\pm$ 0.4	17.3 $\pm$ 0.7	0.78
Камчатка	5	-14.9 $\pm$ 1	16.8 $\pm$ 0.4	0.99
Чукотка	3	-15.3 $\pm$ 0.3	17.1 $\pm$ 1	—

Примечание. M — среднее отклонение, SD — стандартное отклонение, SEAc — площадь стандартного эллипса с поправкой на малый размер выборки.

**Таблица 3.** Доля перекрытия площадей стандартных изотопных эллипсов (SEAc) и результаты сравнения значений  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$  белоспинных альбатросов из разных регионов Северной Пацифики

Регионы	Доля перекрытия SEAc (%)	Результаты тестов $p < 0.05$		
		C + N	C	N
Алеутские о-ва				
~ о. Ребун	7.7	< 0.05	< 0.05	< 0.05
~ Курильские о-ва	10.5	< 0.05	< 0.05	—
~ Камчатка	1.7	< 0.05	—	< 0.05
~ Чукотка	—	< 0.05	< 0.05	—
~ Командорские о-ва	26.5	< 0.05	—	< 0.05
~ о. Ванкувер	45.7	—	< 0.05	—
~ Орегон	< 0.001	< 0.05	< 0.05	—
~ Калифорния	9.77	< 0.05	< 0.05	—
Командорские о-ва				
~ о. Ребун	9.72	< 0.05	< 0.05	—
~ Курильские о-ва	2.3	< 0.05	< 0.05	< 0.05
~ Камчатка	23.7	—	—	—
~ Чукотка	—	—	< 0.05	—
~ о. Ванкувер	12.8	< 0.05	—	< 0.05
~ Орегон	< 0.001	< 0.05	< 0.05	—
~ Калифорния	0.1	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Камчатка				
~ о. Ребун	8.1	< 0.05	< 0.05	—
~ Курильские о-ва	< 0.001	< 0.05	—	< 0.05
~ Чукотка	—	—	—	—
~ о. Ванкувер	< 0.001	< 0.05	—	< 0.05
~ Орегон	4	—	—	—
~ Калифорния	< 0.001	< 0.05	—	< 0.05

Примечание. C + N — результаты попарного многомерного сравнения, C и N — результаты одномерного попарного сравнения. “—” —  $p > 0.05$ .

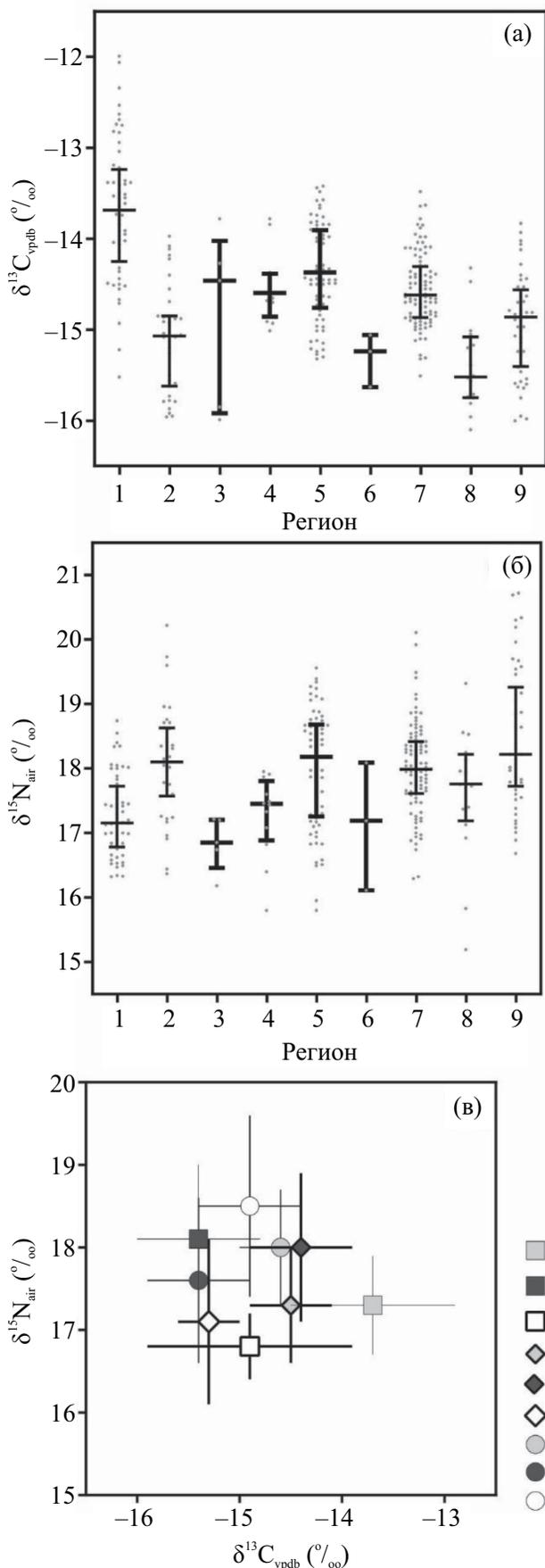
отличаются от альбатросов из всех регионов, кроме птиц о. Ванкувер (табл. 3). Примечательно то, что, вопреки нашим ожиданиям, в целом изотопный состав коллагена костей альбатросов Алеутских и Командорских о-вов в среднем значимо отличается.

Дальнейшие сравнения (критерий Краскела—Уолиса) по каждому изотопу отдельно показали, что и по углероду ( $\chi^2 = 129.57$ ,  $df = 8$ ,  $p\text{-value} < 2.2 \times 10^{-16}$ ), и по азоту ( $\chi^2 = 67.281$ ,  $df = 8$ ,  $p\text{-value} = 1.705 \times 10^{-11}$ ) в исследуемой нами группе регионов есть значимо различные между собой по изотопному составу. Дальнейшие попарные сравнения (критерий Уилкоксона) показали, какие именно регионы отличаются друг от друга и по какому изотопу (табл. 3, рис. 2а, б). Нас в первую очередь интересуют Алеутские и Командорские о-ва и о. Ванкувер. В среднем значения  $\delta^{13}\text{C}$  альбатросов Алеутских о-вов не отличаются от таких Командорских о-вов и немного, но достоверно

отличаются от значений птиц о. Ванкувер. Средние значения  $\delta^{15}\text{N}$  коллагена алеутских альбатросов достоверно выше  $\delta^{15}\text{N}$  альбатросов Командорских о-вов и не отличаются от птиц о. Ванкувер.

Площадь стандартных изотопных эллипсов характеризует размер изотопной ниши. Размер изотопной ниши алеутских альбатросов ( $1.32\%$ , табл. 3) превышает размер изотопных ниш командорских и канадских альбатросов ( $0.8$  и  $0.8\%$ ).

Наибольшее перекрытие площадей стандартных эллипсов наблюдается у альбатросов Алеутских островов и о. Ванкувер ( $45.7\%$ , табл. 3). Следующие по перекрытию с алеутскими альбатросами группы — Командорские ( $26.5\%$ ) и Курильские о-ва ( $10.5\%$ ). Для остальных районов — перекрытие меньше  $10\%$ . Для альбатросов с Командорских о-вов следующая после Алеутских о-вов группа с наибольшим перекрытием — о. Ванкувер ( $12.8\%$ ).



**Рис. 2.** Изотопная изменчивость коллагена костей белоспинных альбатросов из археологических памятников побережья северной части Тихого Океана. Значения  $\delta^{13}C$  (а) и  $\delta^{15}N$  (б), горизонтальная линия — медиана, вертикальная линия — межквартильный размах, серые точки — индивидуальные значения каждого образца; в — средние значения и стандартные отклонения  $\delta^{13}C$  и  $\delta^{15}N$ . Регионы: 1 — о. Ребун (Япония), 2 — Курильские о-ва (РФ), 3 — Камчатка (РФ), 4 — Командорские о-ва (РФ), 5 — Алеутские о-ва (США), 6 — Чукотка (РФ), 7 — о. Ванкувер (Канада), 8 — Орегон (США), 9 — Калифорния (США).



**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Полученные нами результаты об изотопной изменчивости белоспинных альбатросов района Берингова моря в голоцене позволяют дополнить представления об особенностях экологии этого вида до резкого снижения численности в XIX—XX вв.

Для центральной и восточной части Алеутских островов описаны географические паттерны первичной продукции в зависимости от океанических течений, концентрации биогенных элементов и характеристик проливов между островами (Mordy *et al.*, 2005). Наиболее заметная “экологическая граница” проходит по проливу Самалья между восточными и центральными островами. Эти различия приводят к различиям и в первичной биологической продукции, и в содержании стабильных изотопов азота и углерода в фитопланктоне и зоопланктоне (Schell *et al.*, 1998). В западной части Алеутской гряды наблюдается снижение биологической продуктивности по сравнению с восточной частью и меньшее содержание тяжелых изотопов азота и углерода в начальных звеньях пищевых цепей. Однако это не сказалось на изотопном составе голоценовых белоспинных альбатросов Алеутских о-вов, которые не отличаются изотопными подписями из разных частей гряды. Это свидетельствует о том, что алеутские альбатросы не отдавали предпочтений какой-то определенной части гряды и использовали пищевые ресурсы вдоль гряды равномерно. Это подтверждает и относительно большой размер изотопной ниши, который в нашем случае отражает скорее размер региона питания, чем разнообразие пищевых объектов.

Объем нашего материала не позволяет проследить какие-либо изменения изотопной ниши алеутских альбатросов во времени. Но, по аналогии с белоспинными альбатросами о. Ванкувер, мы можем предположить, что изменений в предпочтениях мест питания и у Алеутских альбатросов не происходило.

Обнаруженные нами различия изотопных ниш белоспинных альбатросов Алеутских и Командорских о-вов свидетельствуют о том, что командорские альбатросы выбирали для питания район, отличный от Алеутских о-вов по изотопному фону. Возможно,

это были области Камчатского течения или Западного субарктического круговорота — циклонического апвеллингового круговорота в северо-западной субарктической части Тихого океана, который по своим свойствам отличается от Аляскинского круговорота в северо-восточной субарктической части Тихого океана (Goes *et al.*, 2004; Harrison *et al.*, 2004). В настоящее время отмечаются частые встречи взрослых белоспальных альбатросов на краю шельфа вдоль Алеутских о-вов, где приливные течения и крутой рельеф дна создают сильное вертикальное перемешивание (Piatt *et al.*, 2006; Suryan *et al.*, 2006). Но в районе Командорских о-вов отмечены регулярные встречи молодых птиц (Orben *et al.*, 2018). Возможно, что в голоцене при большей численности белоспальных альбатросов район Командорских островов использовался птицами для питания гораздо активнее, чем в наши дни.

Сильное перекрытие изотопных ниш голоценовых альбатросов Алеутских о-вов и о. Ванкувер может быть связано с большой схожестью разных океанографических параметров этих районов, обусловленной единым происхождением океанических течений — Аляскинского круговорота (циклонический круговорот в заливе Аляска) и Аляскинского струйного течения, которое омывает Алеутские о-ва с юга.

Большой разброс значений  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$  коллагена археологических белоспальных альбатросов отмечается для всех регионов Северной Пацифики. Это можно объяснить тем, что часть птиц постоянно мигрировала между разными районами Северной Пацифики.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты анализа 89 образцов коллагена костей белоспальных альбатросов из отложений различного генезиса Командорско-Алеутской гряды показали, что:

1) Нет значительных различий в значениях  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$  коллагена костей альбатросов вдоль Алеутских о-вов, что говорит о том, что птицы, кормившиеся в этом районе в голоцене, равномерно использовали все ресурсы данного региона.

2) Изотопные ниши голоценовых альбатросов Командорских о-вов и Алеутских о-вов перекрывались незначительно. Видимо, командорские птицы в основном использовали для питания районы Западного субарктического круговорота и Камчатки.

3) Изотопные ниши альбатросов Алеутских о-вов и о. Ванкувер значительно перекрываются, хотя и не полностью. Птицы этих регионов использовали для питания зоны влияния Аляскинского струйного течения и Аляскинского круговорота, схожих по океанографическим параметрам.

4) Несмотря на постоянство выбора районов питания большей частью птиц, часть белоспальных альбатросов Северной Пацифики в голоцене мигрировала между регионами.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22—24—00988)

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Брайцева О.А., Литасова С.Н., Пономаренко А.К. Применение тифрохронологических методов для датирования разреза опорной первобытной стоянки на Восточной Камчатке // Вулканология и Сейсмология. 1983. № 5. С. 18—24.
- Горлова Е.Н., Крылович О.А., Тиунов А.В., Хасанов Б.Ф., Васюков Д.Д., Савинецкий А.Б. Изотопный анализ как метод таксономической идентификации археозоологического материала // Археология, Этнография и Антропология Евразии. 2015. Т. 43. № 1. С. 110—121. [https://doi.org/ 0.17746/1563-0102.2015.43.1.110-121](https://doi.org/0.17746/1563-0102.2015.43.1.110-121)
- Красная книга РСФСР (Животные). М: Россельхозиздат, 1983. 449 с.
- Шунтов В.П. Отряд трубконосые // Птицы СССР. История изучения. Гагары, поганки, трубконосые. М.: Наука, 1982. С. 352—427.
- Anderson M.J. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) // Wiley statsref: statistics reference online. 2014. P. 1—15. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat07841>
- Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing // Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological). 1995. V. 57. № 1. P. 289—300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Brooke M. Albatrosses and petrels across the world. Oxford University Press, 2004. 499 p.
- Burton R.K., Koch P.L. Isotopic tracking of foraging and long-distance migration in northeastern Pacific pinniped // Oecologia. 1999. V. 119. № 4. P. 578—585.
- Carboneras C., Jutglar F., Kirwan G.M. Short-tailed Albatross (*Phoebastria albatrus*). Birds of the World. Cornell Lab of Ornithology. 2020. <https://doi.org/10.2173/bow.shtalb.01>
- Causey D., Corbett D.G., Lefèvre C., West D.L., Savinetsky A.B., Kiseleva N.K., Khassanov B.F. The palaeoenvironment of humans and marine birds of the Aleutian Islands: three millennia of change // Fisheries

- Oceanography. 2005. V. 14. P. 259—276. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2419.2005.00365.x>
- Crockford S.J. Archaeozoology of Adak Island: 6000 years of subsistence history in the central Aleutians // *The People Before: The Geology, Paleocology and Archaeology of Adak Island, Alaska* / British Archaeological Reports International Series. 2012. V. 2322. P. 109—145.
- DeNiro M.J., Epstein S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals // *Geochimica Et Cosmochimica Acta*. 1978. V. 42. № 5. P. 495—506.
- DeNiro M.J., Epstein S. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals // *Geochimica Et Cosmochimica Acta*. 1981. V. 45. № 3. P. 341—351.
- DeNiro M.J. Postmortem preservation and alteration of *in vivo* bone collagen isotope ratios in relation to palaeodietary reconstruction // *Nature*. 1985. V. 317. № 6040. P. 806—809.
- Dinesman L.G., Kiseleva N.K., Savinetsky A.B., Khasanov B.F. Secular dynamics of coastal zone ecosystems of the north-eastern Chukchi peninsula (Chukotka: cultural layers and natural depositions from the last millennia). 1999. 131 p.
- Eda M., Koike H., Kuroo M., Mihara S., Hasegawa H., Higuchi H. Inferring the ancient population structure of the vulnerable albatross *Phoebastria albatrus*, combining ancient DNA, stable isotope, and morphometric analyses of archaeological samples // *Conservation Genetics*. 2012. V. 13. P. 143—151. <https://doi.org/10.1007/s10592-011-0270-5>
- Goes J.I., Sasaoka K., Gomes H. do R., Saitoh S., Saino T.A. Comparison of the Seasonality and Interannual Variability of Phytoplankton Biomass and Production in the Western and Eastern Gyres of the Subarctic Pacific Using Multi-Sensor Satellite Data // *Journal of Oceanography*. 2004. V. 60. P. 75—91. <https://doi.org/10.1023/B:JOCE.0000038320.94273.25>
- Guiry E. Complexities of stable carbon and nitrogen isotope biogeochemistry in ancient freshwater ecosystems: implications for the study of past subsistence and environmental change // *Frontiers in Ecology and Evolution* / 2019. V. 7. P. 313. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00313>
- Guiry E., James M., Cheung C., Royle T.C. Four millennia of long-term individual foraging site fidelity in a highly migratory marine predator // *Communications Biology*. 2022. V. 5. № 1. P. 1—9. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03310-2>
- Guiry E.J., Szpak P. Improved quality control criteria for stable carbon and nitrogen isotope measurements of ancient bone collagen // *Journal of Archaeological Science*. 2021. V. 132. P. 105416. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2021.105416>
- Harrison P.J., Whitney F.A., Tsuda A., Saito H., Tadokoro K. Nutrient and Plankton Dynamics in the NE and NW Gyres of the Subarctic Pacific Ocean // *Journal of Oceanography*. 2004. V. 60. P. 93—117. <https://doi.org/10.1023/B:JOCE.0000038321.57391.2a>
- Hedges R.E., Clement J.G., Thomas C.D.L., O'connell T.C. Collagen turnover in the adult femoral mid-shaft: Modeled from anthropogenic radiocarbon tracer measurements // *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*. 2007. V. 133. № 2. P. 808—816. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20598>
- Hobson K.A., Clark R.G. Assessing avian diets using stable isotopes I: turnover of  $^{13}\text{C}$  in tissues // *Condor*. 1992. V. 94. P. 181—188.
- Hobson K.A., Sease J.L., Merrick R.L., Piatt J.F. Investigating trophic relationships of pinnipeds in Alaska and Washington using stable isotope ratios of nitrogen and carbon // *Marine Mammal Science*. 1997. V. 13. № 1. P. 114—132.
- Jackson A.L., Inger R., Parnell A.C., Bearhop S. Comparing isotopic niche widths among and within communities: SIBER—Stable Isotope Bayesian Ellipses in R // *Journal of Animal Ecology*. 2011. V. 80. № 3. P. 595—602. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2011.01806.x>
- Jørkov M.L.S., Heinemeier J., Lynnerup N. Evaluating bone collagen extraction methods for stable isotope analysis in dietary studies // *Journal of Archaeological Science*. 2007. V. 34. № 11. P. 1824—1829. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2006.12.020>
- Khasanov B.F., Fitzhugh B., Nakamura T., Okuno M., Hatfield V., Krylovich O.A., Vasyukov D., West D.L., Zender E., Savinetsky A.B. New data and synthesis of dR estimates from the northern Pacific Ocean // *Quaternary Research*. 2022. V. 108. P. 150—160. <https://doi.org/10.1017/qua.2020.27>
- Krylovich O.A., Vasyukov D.D., Khasanov B.F., Hatfield V., West D., Savinetsky A.A. Hunter-gatherers subsistence and impact on fauna in the Islands of Four Mountains, Eastern Aleutians, Alaska, over 3000 yr // *Quaternary Research*. 2019. V. 91. № 3. P. 983—1002. <https://doi.org/10.1017/qua.2018.127>
- Lefèvre C., Corbett D., Crockford S., Czederpiltz J., Partlow M., West D. Faunal remains and intersite comparisons // *The People at the End of the World: The Western Aleutians Project and Archaeology of Shemya Island*. Alaska Anthropological Association / Eds Corbett, D., West, D., Lefèvre, C.: Monograph Series, Anchorage. 2010. P. 133—157.
- Longin R. New method of collagen extraction for radiocarbon dating // *Nature*. 1971. V. 230. № 5291. P. 241—242.
- Martinez Arbizu P. pairwiseAdonis: Pairwise multilevel comparison using adonis // R package version 0.4. 2020. V.1. <https://github.com/pmartinezarbizu/pairwiseAdonis>
- Minagawa M., Wada E. Stepwise enrichment of  $^{15}\text{N}$  along food chains: further evidence and the relation between  $\delta^{15}\text{N}$  and animal age // *Geochimica et cosmochimica acta*. 1984. V. 48. № 5. P. 1135—1140.
- Mordy C.W., Stabeno P.J., Ladd C., Zeeman S., Wisegarver D.P., Salo S.A., Hunt G.I. Nutrients and primary production along the eastern Aleutian Archipelago // *Fisheries Oceanography*. 2005. V. 14. Suppl. 1. P. 55—76. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2419.2005.00364.x>
- Oksanen J., Blanchet F., Friendly F., Kindt R., Legendre P., McGlenn D., Minchin P.R., O'Hara R.B., Simpson G.L., Solymos P., Stevens H.H., Szocs E., Wagner H. Package 'vegan'. Community ecology package, version 2.5—7. 2019. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

- Orben R. A., Connor A. J., Suryan R. M., Ozaki K., Sato F., Deguchi T. Ontogenetic changes in at-sea distributions of immature short-tailed albatrosses *Phoebastria albatrus* // *Endangered Species Research*. 2018. V. 35. P. 23–37. <https://doi.org/10.3354/esr00864>
- Piatt J. F., Wetzel J., Bell K., DeGange A. R., Balogh G. R., Drew G. S., Geernaert T., Ladd C., Byrd G. V. Predictable hotspots and foraging habitat of the endangered short-tailed albatross (*Phoebastria albatrus*) in the North Pacific: implications for conservation // *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. 2006. V. 53. № 3–4. P. 387–398. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2006.01.008>
- R Core Team R: a language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing. 2020.
- Ramsey C. B. Radiocarbon calibration: from bane to blessing // *Radiocarbon*. 2023. P. 1–11. <https://doi.org/10.1017/RDC.2023.32>
- Rau G. H., Takahashi T., Marais D. J. D. Latitudinal variations in plankton  $\delta^{13}\text{C}$ : implications for  $\text{CO}_2$  and productivity in past oceans // *Nature*. 1989. V. 341. № 6242. P. 516–518.
- Reimer P. J., Austin W. E., Bard E., Bayliss A., Blackwell P. G., Ramsey C. B., Butzin M., Cheng H., Edwards R. L., Friedrich M., Grootes P. M., Guilderson T. P., Hajdas I., Heaton T. J., Hogg A. G., Hughen K. A., Kromer B., Manning S. W., Muscheler R., Palmer J. G., Pearson C., van der Plicht J., Reimer R. W., Richards D. A., Scott E. M., Southon J. R., Turney C. S. M., Wacker L., Adolphi F., Buntgen U., Capano M., Fahrni S. M., Fogtmann-Schulz A., Friedrich R., Kohler P., Kudsk S., Miyake F., Olsen J., Reining F., Sakamoto M., Sookdeo A., Talamo S. The IntCal20 Northern Hemisphere radiocarbon age calibration curve (0–55 cal kBP) // *Radiocarbon*. 2020. V. 62. № 4. P. 725–757. <https://doi.org/10.1017/RDC.2020.41>
- Savinetsky A. B., West D. L., Antipushina Zh. A., Khassanov B. F., Kiseleva N. K., Krylovich O. A., Pereladov A. M. The reconstruction of ecosystems history of Adak Island (Aleutian Islands) during the Holocene // *The People Before: The Geology, Paleoecology and Archaeology of Adak Island, Alaska / British Archaeological Reports International Series*. 2012. V. 2322. P. 75–106.
- Schell D. M., Barnett B. A. and Vinette K. A. Carbon and nitrogen isotope ratios in zooplankton of the Bering, Chukchi and Beaufort seas // *Marine Ecology Progress Series*. 1998. V. 162. P. 11–23.
- Sigman D., Karsh K., Casciotti K. Ocean process tracers: nitrogen isotopes in the ocean // *Encyclopedia of Ocean Science / Eds Steele J. H. et al.: Academic Press*, 2009. P. 4139–4152.
- Suryan R. M., Sato F., Balogh G. R., Hyrenbach K. D., Sievert P. R., Ozaki K. Foraging destinations and marine habitat use of short-tailed albatrosses: A multi-scale approach using first-passage time analysis // *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. 2006. V. 53. № 3–4. P. 370–386. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2006.01.012>
- Szpak P., Krippner K., Richards M. P. Effects of Sodium Hydroxide Treatment and Ultrafiltration on the Removal of Humic Contaminants from Archaeological Bone // *International Journal of Osteoarchaeology*. 2017. V. 27. № 6. P. 1070–1077. <https://doi.org/10.1002/oa.2630>
- Vokhshoori N. L., McCarthy M. D., Collins P. W., Etnier M. A., Rick T., Eda M., Beck J., Newsome S. D. Broader foraging range of ancient short-tailed albatross populations into California coastal waters based on bulk tissue and amino acid isotope analysis // *Marine Ecology Progress Series*. 2019. V. 610. P. 1–13. <https://doi.org/10.3354/meps12839>
- Walker W. A., Fitzgerald S. M., Collins P. W. Stomach Contents of seven Short-tailed Albatross *Phoebastria albatrus* in the Eastern North Pacific and Bering Sea // *Marine Ornithology*. 2015. V. 43. P. 169–172.

## Isotopic variability of short-tailed Albatrosses bone collagen (*Phoebastria albatrus*) in the Bering Sea area during the holocene

© 2024 O. A. Krylovich\*<sup>#</sup>, S. V. Samsonov\*, E. A. Kuzmicheva\*, A. B. Savinetsky\*

\*Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>#</sup>E-mail: okrylovich@gmail.com

The short-tailed Albatross (*Phoebastria albatrus*) is a rare bird species today, whose numbers declined significantly in the Holocene due to human fishing activities. Bone remains of albatrosses from archaeological sites of Chukotka, Kamchatka and Aleutian Islands, and from coastal sediments of the Commander Islands were used to analyze the content of stable carbon and nitrogen isotopes in bone collagen. Analysis showed that the isotopic niches of Aleutian and Commander albatrosses diverged during the Holocene. Short-tailed albatrosses of the Aleutian Islands are closer to Holocene albatrosses of Vancouver Island (Canada) by isotopic characteristics.

**Key words:** Short-tailed Albatross, *Phoebastria albatrus*, Aleutian Islands, Commander Islands, Bering Sea, isotopic niche, stable isotopes,  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ .