



ИЗВЕСТИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ



Журнал публикует статьи теоретических и экспериментальных исследований по различным аспектам биологии



НАУКА
— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Номер 5, 2024

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

Содержание эндогенных гормонов в эксплантах и каллусах *Lavandula Angustifolia* Mill. на начальных этапах культивирования *in vitro*

Н. Н. Круглова, И. Р. Галин, Н. А. Егорова

551

ГЕНЕТИКА

Некодирующие РНК, вовлеченные в регуляцию сигнальных путей, как возможные маркеры прогрессирования неалкогольной жировой болезни печени

Л. В. Топчиева, И. В. Курбатова, О. П. Дуданова, А. В. Васильева, Г. А. Жулай

562

МИКРОБИОЛОГИЯ

Устойчивые к воздействию тяжелых металлов PGPR штаммы *Pseudomonas* sp., стимулирующие рост люцерны посевной при кадмиевом стрессе

О. В. Чубукова, Л. Р. Хакимова, Р. Т. Матниязов, З. Р. Вершинина

585

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Молекулярные аспекты регуляции экспрессии гомеологичных генов глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы при гипоксии

Д. Н. Федорин, А. Т. Епринцев

596

ЗООЛОГИЯ

Первые сведения об ультратонком строении тегумента “Цистаканта” скребня *Neoechinorhynchus beringianus* Mikhailova, Atrashkevich, 2008 (Eoacanthocephala, Neoechinorhynchidae)

К. В. Кусенко, В. П. Никишин

605

Лейкоцитарный состав иммунных органов *Coregonus migratorius*, зараженного *Dibothriocephalus dendriticus*

О. Е. Мазур, И. А. Кутырев, Л. В. Толочко

610

Автоматизированное выявление и подсчет сайгаков (*Saiga tatarica*) на сверхдетальных спутниковых изображениях с помощью глубоких конволюционных нейронных сетей

В. В. Рожнов, А. Л. Сальман, А. А. Ячменникова, А. А. Луцкекина, П. А. Сальман

621

Наличие и микроструктура пуховых компонентов перьев у представителей девятнадцати отрядов птиц (Aves)

О. Л. Силаева, С. А. Букреев, Р. М. Хацаева

638

ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Динамика продвижения корма по пищеварительному тракту у ночного грызуна *Meriones crassus* как реакция на ритм кормовой активности

Е. И. Наумова, Г. К. Жарова, Т. Ю. Чистова

646

ЭКОЛОГИЯ

Приуроченность Миксоспоридий рода *Kudoa Meglitsch*, 1947 рыб мировой фауны к обитанию на определенных глубинах

В. М. Юрахно

654

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Влияние биотических и абиотических факторов на сообщества эпибионтов камчатского краба Баренцева моря

А. Г. Дворецкий, В. Г. Дворецкий

673

CONTENTS

No. 5, 2024

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

The content of endogenous hormones in explants and calluses of *Lavandula angustifolia* Mill. at the initial stages of *in vitro* culture

N.N. Kruglova, I.R. Galin, N.A. Yegorova

551

GENETICS

Non-coding RNAs involved in the regulation of signaling pathways as possible markers of non-alcoholic fatty liver disease progression

L. V. Topchieva, I. V. Kurbatova, O. P. Dudanova, A. V. Vasilyeva, G. A. Zhulay

562

MICROBIOLOGY

Heavy metals-resistant PGPR strains of *Pseudomonas* sp. stimulating the growth of alfalfa under cadmium stress

O. V. Chubukova, L. R. Khakimova, R. T. Matnyazov, Z. R. Vershinina

585

PLANT PHYSIOLOGY

Molecular aspects of regulation of expression of homeologic glutamate dehydrogenase genes in wheat leaves under hypoxia

D. N. Fedorin, A. T. Eprintsev

596

ZOOLOGY

First knowledge on the ultrathin structure of the tegument “Cystacanth” of the acanthocephala *Neoechinorhynchus beringianus* Mikhailova, Atrashkevich, 2008 (Eoacanthocephala, Neoechinorhynchidae)

K. V. Kusenko, V. P. Nikishin

605

Leukocyte composition of immune organs of *Coregonus migratorius*, infected *Dibothriocephalus dendriticus*

O.E. Mazur, I.A. Kutyrev, L.V. Tolochko

610

Automated identification and counting of saigas (*Saiga tatarica*) by using deep convolutional neural networks in high-resolution satellite images

V. V. Rozhnov, A. L. Salman, A. A. Yachmennikova, A. A. Lushchekina, P. A. Salman

621

The presence and microstructure of down compartments of feathers in representatives of nineteen orders of birds (Aves)

O.L. Silaeva, S.A. Bukreev, R.M. Khatsaeva

638

PHYSIOLOGY OF ANIMALS AND HUMANS

Dynamics of food passing through the digestive tract in the nocturnal rodent *Meriones crassus* as a response to the rhythm of feeding activity

E. I. Naumova, G. K. Zharova, T. Yu. Chistova

646

ECOLOGY

Preferences of the Myxosporeans of genus *Kudoa* Meglitch, 1947 of the world's fauna fishes living at certain depths

V. M. Yurakhno

654

SHORT COMMUNICATIONS

Impact of biotic and abiotic factors on epibiotic communities of the Barents Sea red king crab

A. G. Dvoretzky, V. G. Dvoretzky

673

УДК 633.16:57.085.23:57.042

СОДЕРЖАНИЕ ЭНДОГЕННЫХ ГОРМОНОВ В ЭКСПЛАНТАХ И КАЛЛУСАХ *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* MILL. НА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*

© 2024 г. Н. Н. Круглова*, **, @, И. Р. Галин**, Н. А. Егорова*

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

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

@E-mail: kruglova@anrb.ru

Поступила в редакцию 13.12.2023 г.

После доработки 07.02.2024 г.

Принята к публикации 25.03.2024 г.

Методом иммуноферментного анализа впервые для *Lavandula angustifolia* Mill. изучено содержание эндогенных гормонов (ауксин ИУК, цитокинины, АБК) в эксплантах различных типов (сегменты листа, почки, стебля), индуцированных из них первичных каллусах, а также морфогенных и неморфогенных каллусах на начальных этапах культивирования *in vitro*. Показано максимальное значение уровней гормонов в таких эксплантах, как сегменты почек. Выявлено повышение содержания гормонов в первичных каллусах в сравнении с аналогичными показателями во всех типах эксплантов. В морфогенных каллусах в сравнении с неморфогенными отмечен более высокий уровень активной формы цитокинина (транс-зеатин) и АБК, а также более низкий уровень неактивной формы цитокинина (зеатин-нуклеотид) и ауксина ИУК. Высказано мнение о том, что содержание эндогенных гормонов в эксплантах и каллусах *L. angustifolia* обусловлено их гистологическим статусом. Сделан вывод о единых гистофизиологических механизмах каллусо- и морфогенеза *in vitro* у изученного растения.

Ключевые слова: каллус *in vitro*, морфогенез, ауксины, цитокинины, абсцизовая кислота, лаванда узколистная *Lavandula angustifolia* Mill

DOI: 10.31857/S1026347024050018, **EDN:** ulyulq

Каллус *in vitro* определяется как интегрированная система тканей, возникшая в результате неорганизованной пролиферации дедифференцированных клеток эксплантов (Ikeuchi *et al.*, 2022). Как правило, различают морфогенные каллусы, компетентные клетки которых в оптимальных условиях культуры *in vitro* способны к дальнейшему морфогенезу по различным путям, и неморфогенные каллусы, не способные к таким процессам.

Особый интерес вызывают морфогенные каллусы как экспериментальные модельные системы для изучения закономерностей и особенностей морфогенеза в интактных растениях (Feher, 2023; Kruglova *et al.*, 2023). Кроме того, на основе использования морфогенных каллусов разработаны биотехнологии получения полноценных регенерантов ценных культур (обобщение: Efferth, 2019).

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что образование каллусов и морфогенез *in vitro* в них определяются комплексом взаимосвязанных факторов при главенствующей роли экзогенных гормонов, внесенных в состав

культуральной среды. Разработка этой проблемы на примере ауксинов и цитокининов была начата еще в 1950-е гг. (Skoog, Miller, 1957). К настоящему времени ведущая роль экзогенных полифункциональных ауксинов и цитокининов в индукции формирования каллусов и реализации различных морфогенетических программ развития клеток каллусов *in vitro* подтверждена во многих работах, выполненных на примере растений из различных семейств (Raspor *et al.*, 2021). В ряде работ показано принципиальное значение оптимального баланса между концентрацией экзогенных ауксинов и цитокининов и их эндогенным содержанием в эксплантах (при индуцировании формирования каллусов) и каллусах (в процессах морфогенеза *in vitro*) (Круглова, 2022). В последние годы исследователи уделяют большое внимание абсцизовой кислоте (АБК) – гормону, также характеризующемуся воздействием на различные аспекты морфогенеза в каллусах *in vitro* (Круглова и др., 2018; Bidabadi, Jain, 2020). В целом, ауксины, цитокинины и АБК следует отнести к ведущим гормонам каллусо- и морфогенеза *in vitro*.

Все рассмотренные выше вопросы вызывают большой теоретический и практический интерес. В то же время исследования, посвященные выявлению содержания эндогенных ауксинов, цитокининов и АБК в эксплантах и каллусах, сравнительно немногочисленны (публикации последних лет: Hisano *et al.*, 2016; Seldimirova *et al.*, 2019; Mostafa *et al.*, 2020), а сравнительный анализ уровней этих гормонов в исходных эксплантах и формирующихся из них каллусах различных типов в доступной литературе отсутствует.

Объектом данного исследования явилась лаванда узколистая *Lavandula angustifolia* Mill. — эфиромасличное растение, широко используемое в фармакологии, парфюмерии, косметике (Salehi *et al.*, 2018). Для этого ценного растения разработан ряд биотехнологий получения регенерантов через этап формирования каллусов с последующей индукцией морфогенеза *in vitro* в них (Leelavathi *et al.*, 2020; Егорова, 2021). Нами начаты исследования содержания ряда эндогенных гормонов в каллусах *L. angustifolia* сорта Вдала (Егорова *et al.*, 2020). Так, выявлено, что полученные из листовых эксплантов морфогенные каллусы 4 пассажа, в сравнении с неморфогенными каллусами того же пассажа, характеризовались более высоким содержанием цитокининов и более низким содержанием ауксина индол-3-уксусной кислоты (ИУК) и АБК. В то же время необходимо вести дальнейшие исследования в этом направлении, с привлечением других биотехнологически перспективных сортов *L. angustifolia*. Особенно большое значение могут иметь данные об эндогенном содержании этих гормонов в каллусах на самых начальных этапах культивирования *in vitro*, что может во многом определить приемы регуляции морфогенетического потенциала клеток каллусов в конкретной клеточной технологии.

В связи с этим цель данного исследования состояла в сравнительном анализе содержания эндогенных гормонов (ауксин ИУК, цитокинины, АБК) в различных эксплантах *L. angustifolia*, полученных из них первичных каллусах, а также морфогенных и неморфогенных каллусах на начальных этапах культивирования *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили растения лаванды узколистой *Lavandula angustifolia* Mill. сорта Степная, выращенные в условиях закрытого грунта при температуре 22–24 °С, освещенности 3–5 клк и 16-часовом фотопериоде.

Применяли методы культуры *in vitro* органов растений как общепринятые (Калинин и др., 1980), так и разработанные авторами для различных клеточных технологий лаванды узколистой (Егорова, 2021).

В качестве эксплантов использовали сегменты листьев, стеблей и почек донорных растений. Экспланты стерилизовали в 70% этаноле (40 с) и 50% растворе препарата Брадофен 10Н (ФЛОРИН АО, Венгрия) (12 мин) и трижды промывали автоклавируемой дистиллированной водой. Асептические работы проводили в условиях ламинарного бокса БАВнп-01-Ламинар-С-1,2 (Lamsystems, Россия).

Для получения первичных каллусов экспланты помещали на агаризованную питательную среду, содержащую макро-, микросоли и витамины по прописи Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962) с добавлением α -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). Культивирование эксплантов проводили в пробирках при температуре $26 \pm 2^\circ\text{C}$, относительной влажности воздуха 70%, освещенности 2–3 клк, 16-часовом фотопериоде.

Через 4–6 недель культивирования первичные каллусы отделяли от эксплантов и переносили в пробирки на агаризованные среды различного состава. Неморфогенные каллусы получали на среде МС160 (состав среды приведен выше), морфогенные каллусы — на среде МС594 (среда составлена по прописи Мурасиге и Скуга с добавлением БАП в концентрации 0.5 мг/л и 0.5 мг/л тидиазурана (ТДЗ, Sigma, USA), по: Егорова, 2021). Каллусные транспланты при указанных выше физических условиях культивировали в течение 4–6 недель для получения и наращивания массы каллусов 1 пассажа.

Количественное содержание эндогенных гормонов (ИУК, цитокинины, АБК) выявляли методом иммуноферментного анализа (ИФА) в эксплантах перед их введением в асептическую культуру *in vitro*, первичных каллусах после отделения их от эксплантов, а также в морфогенных и неморфогенных каллусах 1 пассажа в конце цикла выращивания (30–35 сут). Навески растительного материала объединяли так, чтобы у эксплантов каждого типа их общая масса составила 2–3 г, у каллусов каждого типа — 5–6 г.

Навески помещали в пенициллиновые флаконы и замораживали в низкотемпературном морозильнике Thermo Scientific Forma 900 (Thermo Scientific, США) при -80°C . Далее флаконы переносили в камеру лиофилизатора FreeZone 2.5 L (Labconco, США) и проводили сублимационную сушку при -50°C и уровне вакуума 0.1 мБар в течение 3 сут. После лиофильной сушки флаконы с материалом хранили при 4°C в фармацевтическом холодильнике НУС-580 (Haier, США). Далее лиофилизированный материал гомогенизировали, экстрагировали 70% этанолом и инкубировали в фармацевтическом холодильнике НУС-580 (Haier, США) при 4°C в течение 12 ч. Проводили фильтрацию гомогенизата

с помощью бумажных фильтров для отделения жидкой фазы и дальнейшее упаривание фильтрата до водного остатка.

Экстракцию ИУК и АБК из аликвоты водного остатка проводили по модифицированной схеме с уменьшением объема (Vysotskaya *et al.*, 2008). Экстракцию проводили диэтиловым эфиром и метилировали диазометаном. Полученную эфирную фазу упаривали до сухого остатка, который далее восстанавливали 80% этанолом, его аликвоту в серии разведений добавляли в лунки планшетов и проводили ИФА в тест-системах с использованием антител, специфичных к ИУК и АБК.

Содержание цитокининов определяли по (Kudoyarova *et al.*, 2014). Для этого цитокинины из водного остатка концентрировали на картридже C18 (Sep-Pak Classic C18) и элюировали этанолом, далее выпаривали в ротационном испарителе. Сухой остаток восстанавливали в 80% этаноле и наносили на пластины силикагеля тонкослойной хроматографии для разделения метаболитов цитокининов. Различные формы цитокининов (транс-зеатин, зеатин-рибозид,

зеатин-нуклеотид) элюировали из соответствующих зон фосфатным буфером, затем аликвоту в серии разведений добавляли в лунки планшетов и проводили ИФА в тест-системах с использованием антител, специфичных к зеатину.

Каждый вариант опыта анализировали в 3–5-кратной повторности. Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением программы Microsoft Office Excel 2010. На рисунках представлены средние арифметические значения и ошибки средних. Достоверность различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксплантами (рис. 1а) послужили сегменты листьев, стеблей и почек растений *L. angustifolia*. На рис. 2 представлены результаты выявления содержания ИУК, АБК и цитокининов в различных эксплантах после их отделения от донорных

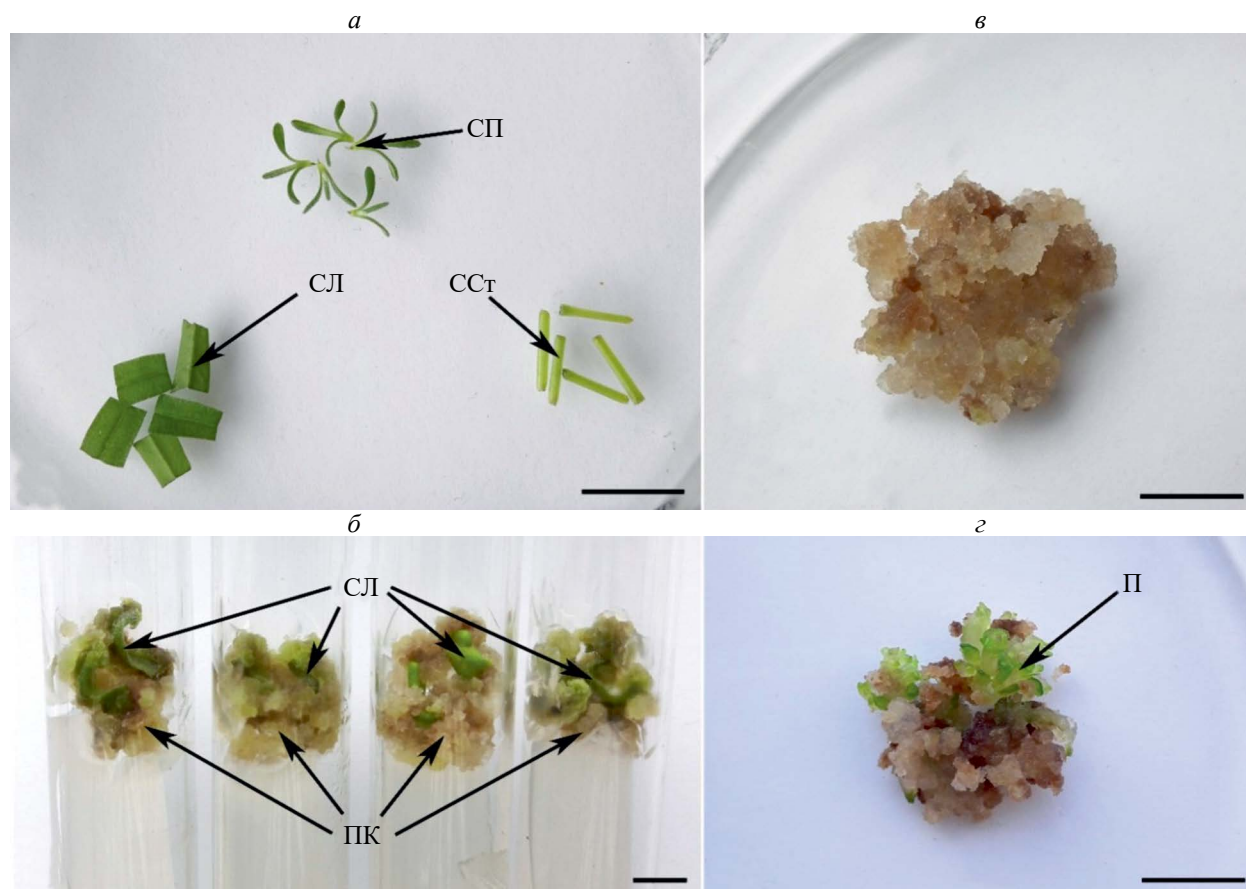


Рис. 1. Экспланты (а), первичные каллусы (б), неморфогенные (в) и морфогенные (г) каллусы 1 пассажа *L. angustifolia*, полученные из различных эксплантов. Условные обозначения: П – почка, ПК – первичный каллус, СЛ – сегмент листа, СП – сегмент почки, ССт – сегмент стебля. Масштаб: 10 мм.

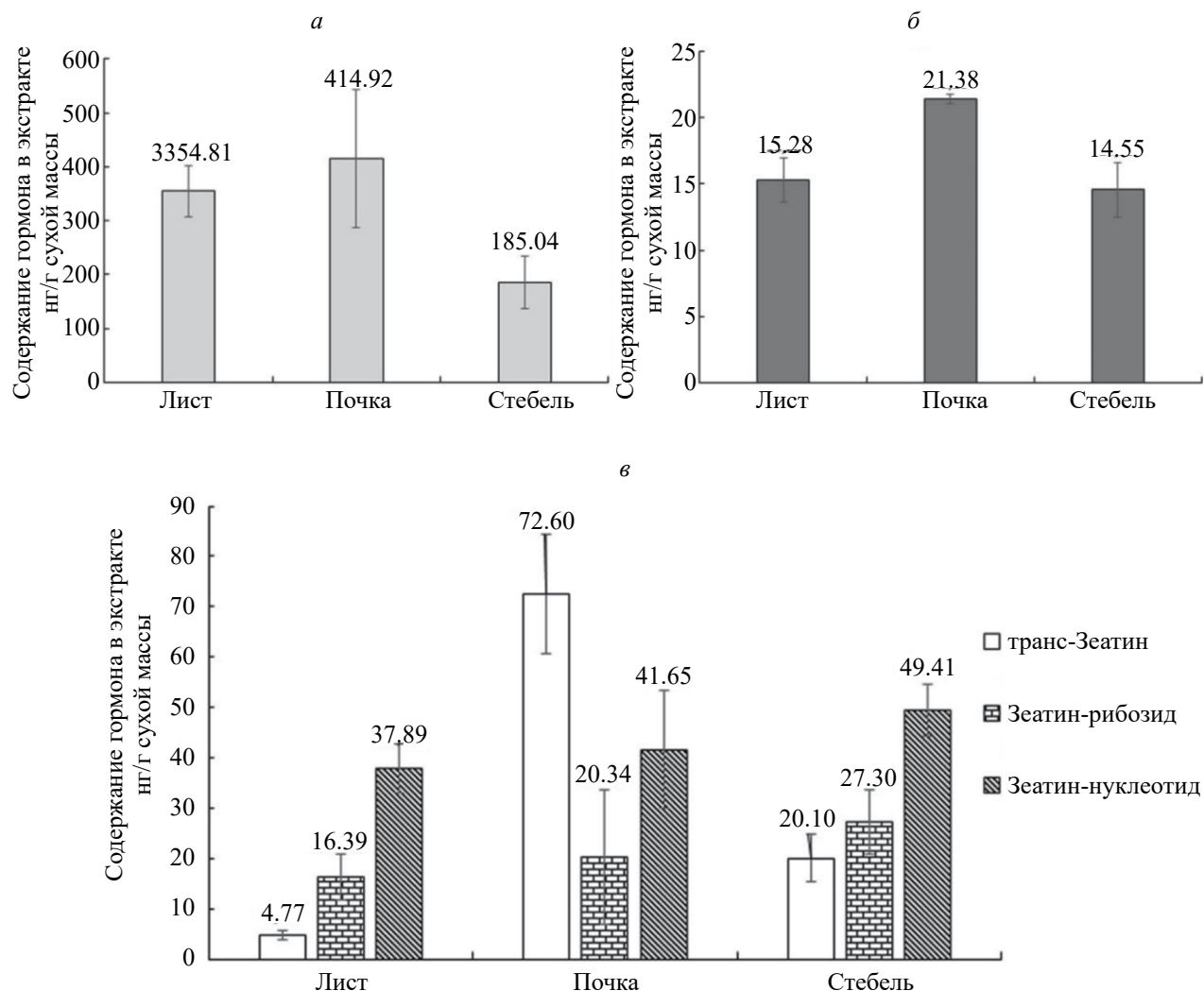


Рис. 2. Содержание эндогенных гормонов в различных эксплантах *L. angustifolia*: а – ИУК, б – АБК, в – цитокинины.

растений, перед инокуляцией на питательную среду. Максимальные из выявленных уровни ИУК (414.92 нг/г) и АБК (21.38 нг/г) отмечены в сегментах почек, тогда как в сегментах листьев/стеблей эти показатели ниже: ИУК 354.81/185.04 нг/г, АБК 15.28/14.55 нг/г, соответственно. Что касается цитокининов, то показатель транс-зеатина в сегментах почек (72.60 нг/г) значительно превышает аналогичные показатели в сегментах листьев/стеблей (4.77/20.10 нг/г, соответственно), тогда как уровни остальных форм цитокининов примерно одинаковы, при некотором повышении показателей в сегментах стеблей. Так, показатели зеатин-рибозида/зеатин-нуклеотида составили в сегментах стеблей 27.30/49.41 нг/г, в сегментах листьев 16.39/20.34 нг/г и 37.89/41.65 нг/г, соответственно.

Первичные каллусы *L. angustifolia* формировались на поверхности различных эксплантов

через 2–3 недели после введения в культуру *in vitro* на питательную среду. По морфологическим показателям первичные каллусы представляли собой рыхлые недифференцированные образования со множеством инвагинаций, как это показано на примере таких каллусов, полученных из сегментов листа (рис. 1б). Результаты выявления содержания эндогенных ИУК, АБК и цитокининов в первичных каллусах представлены на рис. 3. Их анализ свидетельствует о примерно равных уровнях ИУК (2806.50 нг/г, 2563.60 нг/г, 3189.54 нг/г) и АБК (82.33 нг/г, 98.52 нг/г, 88.99 нг/г) в каллусах, полученных из различных эксплантов (лист, почка, стебель, соответственно). В то же время выявлено значительное повышение показателя цитокинина зеатин-нуклеотида в каллусах, полученных из сегментов стеблей (377.15 нг/г), в сравнении с аналогичными показателями в каллусах, полученных

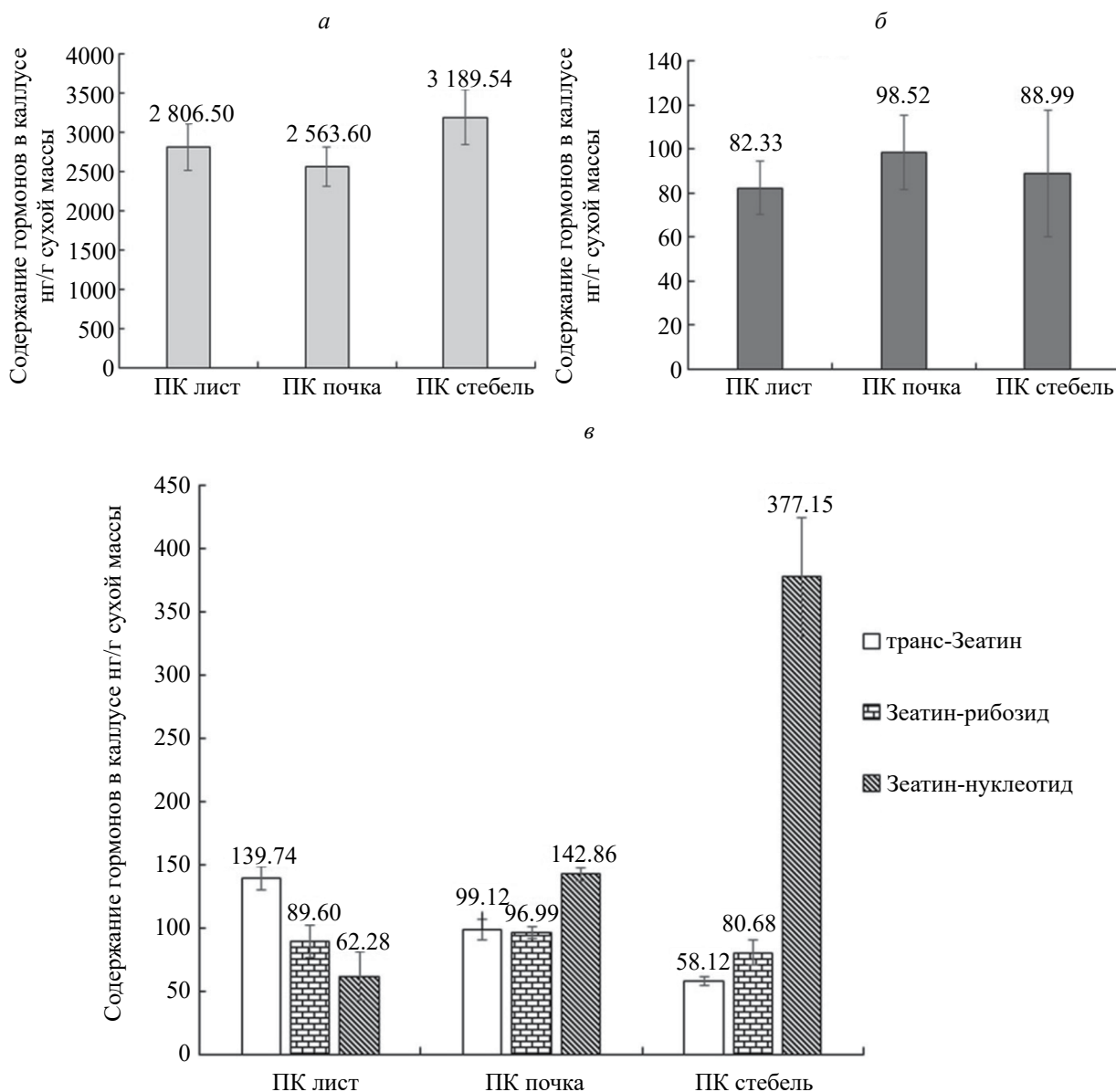


Рис. 3. Содержание эндогенных гормонов в первичных каллусах *L. angustifolia*, полученных из различных эксплантов: а – ИУК, б – АБК, в – цитокинины.

из сегментов почек (142.86 нг/г) и особенно сегментов листьев (62.28/ нг/г).

Через 4–6 недель первичные каллусы отделяли от эксплантов и для получения неморфогенных каллусов переносили на свежую среду МС160. Проллиферирующие в таких условиях каллусы культивировали в течение 5–6 недель до стационарной фазы роста (1 пассаж). По морфологическим данным неморфогенные каллусы 1 пассажа, как и первичные каллусы, характеризовались рыхлой структурой и наличием множества инвагинаций на своей поверхности (рис. 1в). Для получения морфогенных каллусов первичные каллусы

переносили на среду МС594 и культивировали в течение 5–6 недель для получения и наращивания массы каллусов (1 пассаж). По морфологическим данным, морфогенные каллусы 1 пассажа характеризовались наличием на их поверхности почек (рис. 1г) и листьев. Следует отметить, что в условиях выполненных экспериментов морфогенные каллусы 1 пассажа были получены из первичных каллусов, индуцированных из листа и почки, но не стебля.

Показатели содержания эндогенных ИУК, АБК и цитокининов в неморфогенных и морфогенных каллусах 1 пассажа отражены на рис. 4.

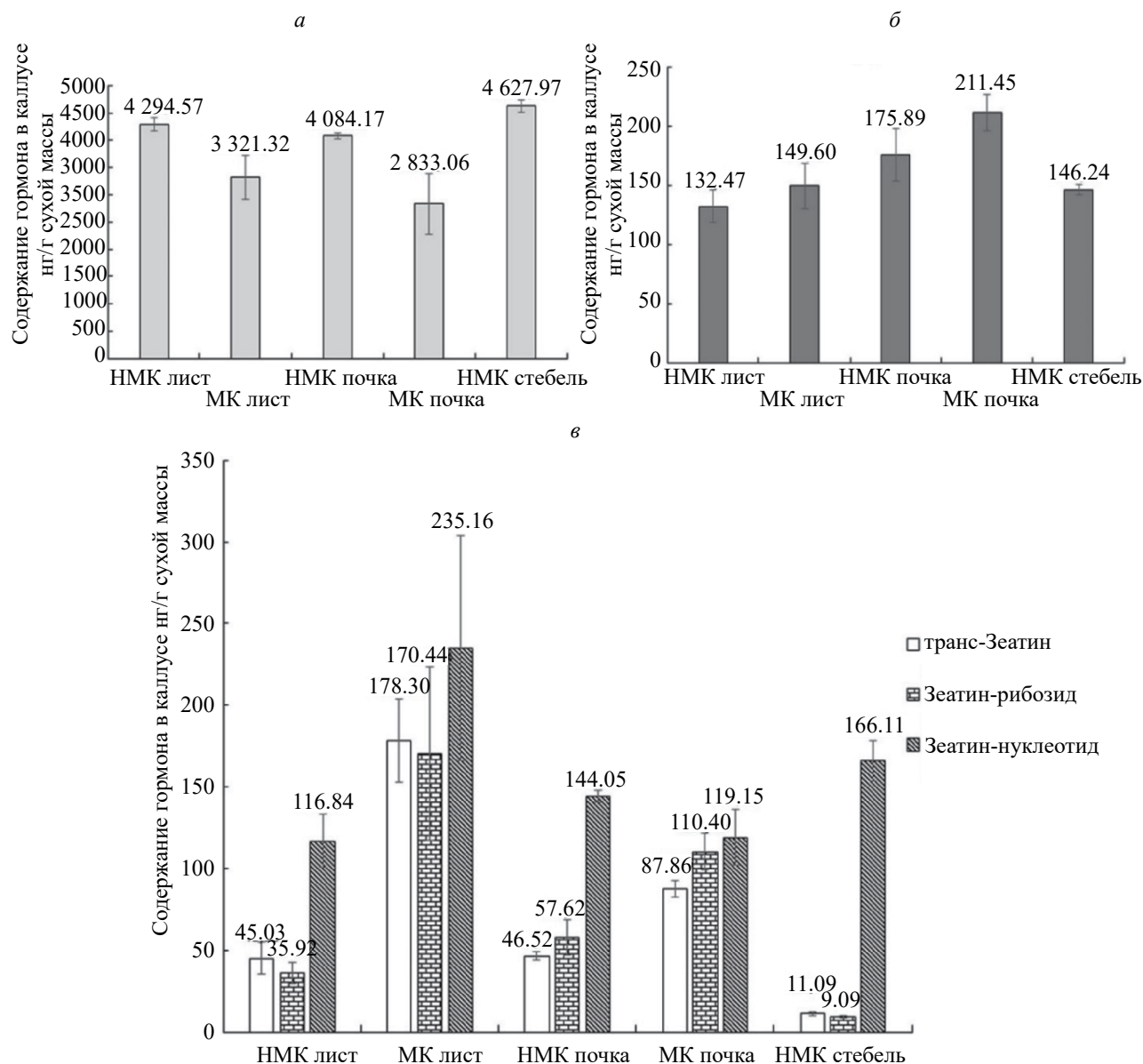


Рис. 4. Содержание эндогенных гормонов в морфогенных и неморфогенных каллусах 1 пассажа *L. angustifolia*, полученных из различных эксплантов: а – ИУК, б – АБК, в – цитокинины. Примечание: данные по содержанию эндогенных гормонов в морфогенных каллусах 1 пассажа, полученных из стебля, отсутствуют, пояснение в тексте.

Как свидетельствует их анализ, в морфогенных каллусах выявлено более низкое содержание ИУК по сравнению с неморфогенными: соответственно, 3321.32 нг/г и 4294.57 нг/г при использовании сегментов листьев, 2833.06 нг/г и 4084.17 нг/г при использовании сегментов почек. В то же время уровни АБК выше в морфогенных каллусах по сравнению с неморфогенными, при всех использованных эксплантах: 149.6 нг/г против 132.47 нг/г при использовании сегментов листьев, 211.45 нг/г против 175.89 нг/г при использовании сегментов почек.

В морфогенных каллусах, полученных из сегментов листьев, в сравнении с неморфогенными каллусами аналогичного происхождения, выявлены и более высокие уровни всех изученных форм цитокинина. Так, показатель зеатин-нуклеотида в морфогенных каллусах превышает аналогичный показатель неморфогенных каллусов почти вдвое (235.16 нг/г и 116.84 нг/г, соответственно), показатель транс-зеатина – почти вчетверо (178.30 нг/г и 45.03 нг/г), показатель зеатин-рибозида – почти впятеро (170.44 нг/г и 35.92 нг/г соответственно). Эта тенденция сохраняется и в морфогенных каллусах,

полученных из сегментов почек: показатели транс-зеатина (87.86 нг/г) и зеатин-рибозид (110.40 нг/г) выше аналогичных показателей неморфогенных каллусов (46.52 нг/г и 57.56 нг/г, соответственно). Однако в таких морфогенных каллусах отмечен более низкий (119.15 нг/г) уровень зеатин-нуклеотида в сравнении с неморфогенными каллусами (144.05 нг/г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В качестве эксплантов для получения каллусов используют различные части донорных растений. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что наибольший “выход” первичных каллусов достигается, как правило, при введении в культуру *in vitro* органов на ранних стадиях развития (Зинатуллина, 2021; Kruglova *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021; Kharel *et al.*, 2022). Это эмпирическое наблюдение можно объяснить гистологическим статусом таких эксплантов — наличием в них меристематических или еще слабо специализированных клеток, способных к переходу в состояние дедифференциации, последовательным делениям с пролиферацией дедифференцированных клеток, т.е. формированию каллуса (Feher, 2019; Круглова, 2022). Каллусообразование связано со структурной перестройкой инициальных клеток эксплантов при участии ряда генов (*YUC1*, *YUC4*, *WOX5*, *WOX11* и др.) (Ikeuchi *et al.*, 2019; Feher, 2023). Большую роль в этом процессе играет гормональный статус эксплантов на ранних стадиях развития и особенно наличие важнейших гормонов морфогенеза — ауксинов, цитокининов, АБК (Bidabadi, Jain, 2020).

Анализ содержания эндогенных гормонов в эксплантах *L. angustifolia* подтверждает эти наблюдения. Так, максимальный из выявленных уровень ИУК, АБК и особенно цитокинина транс-зеатина отмечен в сегментах почек — активно развивающихся структур, тогда как в сегментах специализированных структур — листьев и стеблей — показано пониженное содержание этих гормонов (рис. 2). Эти результаты согласуются с полученными нами данными о том, что у *L. angustifolia* именно почки характеризовались наибольшей в сравнении с листьями и стеблями частотой формирования первичных каллусов, причем на более широком спектре питательных сред (неопубл. данные).

Безусловно, было бы интересно исследовать содержание эндогенных гормонов в тех органах интактных растений *L. angustifolia*, сегменты которых послужили эксплантами при проведении экспериментов, и сравнить полученные показатели с аналогичными показателями эксплантов. Однако такого рода исследования оказались невозможными из-за отсутствия доступных методик. В то же время, исходя из общих подходов, можно полагать, что

содержание, например, АБК в изученных эксплантах повышено в сравнении с органами интактных растений. Действительно, АБК определяется как “гормон стресса” (Fidler *et al.*, 2022), а отделение органа от донорного растения расценивается как своеобразный раневой стресс (Feher, 2023; Kruglova *et al.*, 2023). В целом, влияние гормональных сигналов в эксплантах на стрессовую индукцию образования каллуса *in vitro* вызывает большой интерес исследователей, во многом обусловленный раневой регенерацией органов интактных растений, на начальных этапах также состоящей в формировании каллуса (Ikeuchi *et al.*, 2022).

Повышение уровней АБК в эксплантах *L. angustifolia* может быть также обусловлено наличием значительного количества вторичных метаболитов в интактных растениях этого объекта (Salehi *et al.*, 2018; Егорова, 2021). Так, в работе Донг с соавт. (Dong *et al.*, 2022) показано влияние фактора транскрипции *LaMYC4*, ответственного за биосинтез терпеноидов у *L. angustifolia*, на увеличение содержания АБК в трансгенных сверхэкспрессирующих терпеноиды растениях табака. В целом, влияние различных вторичных метаболитов в эксплантах на процессы каллусогенеза *in vitro* продемонстрировано для многих растений (Ozyigit *et al.*, 2023).

Сравнение уровней эндогенных гормонов во всех типах эксплантов (рис. 2) и полученных из них первичных каллусах (рис. 3) свидетельствует о повышении абсолютного значения всех показателей именно в каллусах. Такие результаты, по нашему мнению, обусловлены наращиванием массы первичных каллусов в течение достаточно длительного (4–6 недель) культивирования *in vitro*, что сопровождается их значительной пролиферацией, а значит, гистологическими изменениями. Особенно значительный рост отмечен в показателях содержания цитокинина зеатин-нуклеотида: уровень этого гормона в первичных каллусах, полученных из стеблей (рис. 3в), превышал аналогичный показатель в исходных эксплантах (рис. 2в) более чем в 70 раз и намного превышал аналогичные показатели в каллусах, полученных из листьев и почек (рис. 3в). В работе, выполненной с использованием анализа транскриптома и количественного гормонального анализа, показано, что в интактных растениях *Arabidopsis thaliana* ранение стебля, индуцирующее формирование каллуса, изменяет экспрессию генов, участвующих в биосинтезе цитокининов, что приводит к повышенному накоплению этих гормонов (Ikeuchi *et al.*, 2017). Возможно, и в случае с первичными каллусами *L. angustifolia* работает тот же механизм.

В результате проведенных экспериментов из первичных каллусов получены два контрастных типа каллусов 1 пассажа — неморфогенный и морфогенный, различающиеся по морфологическим показателям (ср. рис. 1в и рис. 1г). Важно

подчеркнуть, что контрастные типы каллусов 1 пассажа *L. angustifolia* отличаются и по гистологическим показателям, как это установлено нами ранее (Круглова и др., 2024). Так, неморфогенные каллусы представлены паренхимной тканью, тогда как в морфогенных каллусах выявлены такие пути морфогенеза *in vitro*, как органогенез *de novo* (листовые почки на разных стадиях геммо/каулогенеза) и соматический эмбриогенез *in vitro* (соматические зародыши на ранних стадиях эмбриогенеза). Кроме того, в толще морфогенных каллусов отмечены многочисленные морфогенетические очаги — группы недифференцированных меристематических клеток, которые постепенно преобразуются в меристемы будущих побегов и органов соматических зародышей. Такие морфогенетические очаги расцениваются как гистологическая основа путей морфогенеза *in vitro* в каллусах (Зинатуллина, 2023; Kruglova *et al.*, 2023).

Анализ содержания эндогенных гормонов в морфогенных и неморфогенных каллусах 1 пассажа *L. angustifolia* показал следующее.

В морфогенных каллусах в сравнении с неморфогенными отмечен более высокий уровень активной формы цитокинина — транс-зеатина, при использовании листовых эксплантов. Содержание этой формы цитокинина в морфогенном каллусе почти вчетверо превышало его содержание в неморфогенном (рис. 4в). Повышенное содержание этой активной формы цитокинина может быть объяснено морфогенетической активностью морфогенных каллусов, формированием и развитием в них множественных морфогенетических очагов, соматических зародышей и особенно органов — почек. Именно эндогенные цитокинины считаются основными кандидатами на получение специализированных генных сигналов постэмбрионального органогенеза *de novo*, главным образом специфичного для почек гомеодоменированного регулятора *WUSCHEL* (Smeringai *et al.*, 2023). В то же время в неморфогенных каллусах, полученных из сегментов почек, отмечен более высокий уровень зеатин-нуклеотида в сравнении с морфогенными каллусами. Поскольку зеатин-нуклеотид относят к неактивной форме цитокининов, то эти данные лишний раз подтверждают неморфогенную природу таких каллусов.

В морфогенных каллусах выявлено более низкое содержание эндогенного ауксина ИУК по сравнению с неморфогенными, при использовании в качестве эксплантов как сегментов листьев, так и сегментов почек (рис. 4а). Такой результат может быть обусловлен гормональными особенностями выявленных в морфогенных каллусах путей морфогенеза — органогенеза *de novo* и соматического эмбриогенеза *in vitro*. Полагают, что в процессе органогенеза в каллусах эндогенные ауксины в целом играют не такую большую роль, как эндогенные цитокинины (Raspor *et al.*, 2021). Более того, ингибирование биосинтеза и полярного транспорта

эндогенного ауксина ИУК в каллусах *Arabidopsis thaliana* приводило к повышению регенерации органов *de novo* (Ohbayashi *et al.*, 2022).

В то же время именно эндогенные ауксины важны при таком пути морфогенеза в каллусах, как соматический эмбриогенез *in vitro* (Wojcik *et al.*, 2020). Однако потребность в эндогенных ауксинах возникает главным образом на поздних стадиях развития соматических зародышей *in vitro*, как это показано на примере *Arabidopsis thaliana* (Karami *et al.*, 2023). Полученные нами результаты подтверждают это наблюдение, поскольку развитие соматических зародышей *L. angustifolia* в морфогенных каллусах 1 пассажа останавливалось на достаточно ранней сердечковидной стадии (Круглова и др., 2024), что, по-видимому, и обусловило сравнительно невысокий уровень в них ауксина ИУК.

С формированием и развитием соматических зародышей следует связать и уровни эндогенной АБК в морфогенных каллусах 1 пассажа *L. angustifolia*. Как свидетельствуют полученные результаты, показатели содержания эндогенной АБК выше в морфогенных каллусах по сравнению с аналогичными показателями неморфогенных каллусов, при всех использованных эксплантах (рис. 4б). Возможно, в данном случае повышение содержания АБК обусловлено ролью этого “гормона стресса” в формировании и развитии соматических зародышей, поскольку в работах последних лет соматический эмбриогенез *in vitro* рассматривается как ответная стрессовая реакция экспланта на раннее повреждение (Spinoso-Castillo, Bello-Bello, 2022).

Следует подчеркнуть, что важное направление современных исследований состоит в изучении синергетического/антагонистического влияния (в англоязычной литературе: crosstalk) эндогенных гормонов в регуляции путей морфогенеза в каллусных культурах *in vitro*. Установлено, например, что в каллусах пшеницы и ячменя способность к соматическому эмбриогенезу *in vitro* определялась балансом содержания в них эндогенных ИУК и АБК (Seldimirova *et al.*, 2019). В каллусах *Fouquieria splendens* (Salinas-Patino *et al.*, 2018) и *Brassica juncea* (Lu *et al.*, 2020) цитокинин влиял на экспрессию ряда генов в сигнальных путях ауксина. В каллусах *Arabidopsis thaliana* ранние стадии формирования примордиев побегов зависели от сигналов ауксина, тогда как формирование апикальной меристемы побега на более поздних стадиях развития примордиев регулировалось цитокинином, однако под влиянием ауксиновой сигнализации (Cosic, Raspor, 2022).

Такого рода исследования по отношению к *L. angustifolia* еще предстоит выполнить, поскольку выявленные абсолютные величины показателей содержания изученных эндогенных гормонов в каллусах, скорее всего, играют не такую важную роль, как их взаимное влияние.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые полученные для *L. angustifolia* результаты подтверждают представленные в литературе данные об активном участии эндогенных гормонов (ауксин ИУК, цитокинины и АБК) как в индукции каллусообразования из различных типов эксплантов, так и в каллусогенезе на начальных этапах культивирования *in vitro*.

Сравнительный анализ уровней изученных эндогенных гормонов свидетельствует (1) о максимальном их значении в таких эксплантах, как сегменты почек; (2) о повышении их содержания в первичных каллусах в сравнении с эксплантами; (3) о более высоком уровне активной формы цитокинина (транс-зеатин) и АБК, а также более низком уровне неактивной формы цитокинина (зеатин-нуклеотид) и ауксина ИУК в морфогенных каллусах 1 пассажа в сравнении с неморфогенными того же пассажа. По нашему мнению, содержание изученных гормонов в эксплантах, первичных каллусах, а также морфогенных и неморфогенных каллусах *L. angustifolia* напрямую обусловлено их гистологическим статусом. В целом, можно говорить о единых гистофизиологических механизмах каллусо- и морфогенеза *in vitro* у изученного растения.

БЛАГОРАДНОСТИ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Егорова Н.А. Биотехнология эфиромасличных растений: создание новых форм и микроразмножение *in vitro*. Симферополь: ИД “Автограф”, 2021. 315 с.

Зинатуллина А.Е. Структурные особенности клеток эксплантов *in vivo* и формирование морфогенных каллусов *in vitro* (обзор) // Биомика. 2021. Т. 13. № 1. С. 8–19.

DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-2.

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.

Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии. Киев: Наукова думка, 1980. 468 с.

Круглова Н.Н. Каллусообразование и каллусогенез *in vitro* у злаков: роль гормонального баланса // Изв. Уфимск. науч. центра РАН. 2022. № 1. С. 52–59.

DOI: 10.31040/2222-8349-2022-0-1-52-59.

Круглова Н.Н., Зинатуллина А.Е., Егорова Н.А. Морфогенез *in vitro* в каллусах лаванды узколистной *Lavandula angustifolia* Mill.: гистологические аспекты // Изв. РАН. Сер. биол. 2024. № 3. С. 297–306. EDN: VBEPNU.

DOI: 10.31857/S1026347024030014.

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Веселов Д.С. Абсцизовая кислота в системах культуры *in vitro* эксплантов // Изв. Уфимск. науч. центра РАН. 2018. № 2. С. 55–60.

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-0-2-55-60.

Bidabadi S.S., Jain S.M. Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of In Vitro Plant Regeneration // Plants. 2020. V. 9.

DOI: 10.3390/plants9060702.

Cosic T., Raspor M. The Role of Auxin and Cytokinin Signaling Components in *de novo* Shoot Organogenesis // Aftab T. (ed.) Auxins, Cytokinins and Gibberellins Signaling in Plants. Signaling and Communication in Plants. Springer, Cham, 2022.

DOI: 10.1007/978-3-031-05427-3_3.

Dong Y., Zhang W., Li J., Wang D., Bai H., Li H., Shi L. The transcription factor LaMYC4 from lavender regulates volatile terpenoid biosynthesis // BMC Plant Biol. 2022. V. 22. Iss. 289.

DOI: 10.1186/s12870-022-03660-3.

Efferth T. Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures // Engineering. 2019. V. 5. P. 50–59.

DOI: 10.1016/j.eng.2018.11.006.

Feher 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.

Feher A. A Common Molecular Signature Indicates the Pre-Meristematic State of Plant Calli // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. Iss. 17.

DOI: 10.3390/ijms241713122.

Fidler J., Graska J., Gietler M., Nykiel M., Prabucka B., Rybarczyk-Plonska A., Muszynska E., Morkunas I., Labudda M. PYR/PYL/RCAR Receptors Play a Vital Role in the Absciscic-Acid-Dependent Responses

- of Plants to External or Internal Stimuli // *Cells*. 2022. V. 11. Iss. 8.
DOI: 10.3390/cells11081352.
- Hisano H., Matsuura T., Mori I.C., Yamane M., Sato K. Endogenous hormone levels affect the regeneration ability of callus derived from different organs in barley // *Plant Physiol. Biochem.* 2016. V. 99. P. 66–72.
DOI: 10.1016/j.plaphy.2015.12.005.
- 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 WUSSEL-RELATED HOMEBOX 13 is required for callus growth and organ reconnection // *Plant Physiol.* 2022. V. 188. Iss. 1. P. 425–441.
DOI: 10.1093/plphys/kiab510.
- Ikeuchi M., Iwase A., Ryman B., Lambolez A., Kojima M., Takebayashi Y., Heyman J., Watanabe S., Seo M., De Veylder L., Sakakibara H., Sugimoto K. Wounding Triggers Callus Formation via Dynamic Hormonal and Transcriptional Changes // *Plant Physiol.* 2017. V. 175. Iss. 3. P. 1158–1174.
DOI: 10.1104/pp.17.01035.
- Ikeuchi M., Favero D.S., Sakamoto Y., Iwase A., Coleman D., Ryman B., Sugimoto K. Molecular Mechanisms of Plant Regeneration // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2019. V. 70. P. 377–406.
DOI: 10.1146/annurev-arplant-050718-100434.
- Karami O., Philipsen C., Rahimi A., Nurillah A.R., Boutiller K., Offringa R. Endogenous auxin maintains embryonic cell identity and promotes somatic embryo development in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2023. V. 113. Iss. 1. P. 7–22.
DOI: 10.1111/tpj.16024.
- Kharel P., Creech M.R., Nguyen C.D., Vendrame W.A., Munoz P.P., Huo H. Effect of explant type, culture medium, and BAP concentration on *in vitro* shoot development in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2022. V. 58. P. 1057–1065.
DOI: 10.1007/s11627-022-10299-0.
- 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. Iss. 2. P. 533–545.
DOI: 10.3390/ijpb14020042.
- Kudoyarova G.R., Korobova A.V., Akhiyarova G.R., Arkhipova T.N., Zaytsev D.Yu., Prinsen E., Egutkin N.L., Medvedev S.S., Veselov S.Yu. Accumulation of cytokinins in roots and their export to the shoots of durum wheat plants treated with the protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) // *J. Exp. Bot.* 2014. V. 65. P. 2287–2294.
DOI: 10.1093/jxb/eru113.
- Leelavathi D., Raajasubramanian D., Ramu L., Haseena R., Midhila P., GovindaRaju M.V., Lavanya G., Chetan H.C., Narendra K. *Lavandula angustifolia* L. plants regeneration from *in vitro* leaf explants-derived callus as conservation strategy // *Biotechn. Veg.* 2020. V. 20. № 2. P. 75–82.
- Lu H., Xu P., Hu K., Xiao Q., Wen J., Yi B., Ma C., Tu J., Fu T., Shen J. Transcriptome profiling reveals cytokinin promoted callus regeneration in *Brassica juncea* // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2020. V. 141. P. 191–206.
DOI: 10.1007/s11240-020-01779-5.
- Mostafa H.H.A., Wang H., Song J., Li X. Effects of genotypes and explants on garlic callus production and endogenous hormones // *Sci Rep.* 2020. V. 10. Iss. 1.
DOI: 10.1038/s41598-020-61564-4.
- 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.
- Ohbayashi I., Sakamoto Y., Kuwae H., Kasahara H., Sugiyama M. Enhancement of shoot regeneration by treatment with inhibitors of auxin biosynthesis and transport during callus induction in tissue culture of *Arabidopsis thaliana* // *Plant Biotechnol.* 2022. V. 39. Iss. 1. P. 43–50.
DOI: 10.5511/plantbiotechnology.21.1225a.
- Ozyigit I.I., Dogan I., Hocaoglu-Ozyigit A., Yalcin B., Erdogan A., Yalcin I.E., Cabi E., Kaya Y. Production of secondary metabolites using tissue culture-based biotechnological applications // *Front. Plant Sci.* 2023. V. 14.
DOI: 10.3389/fpls.2023.1132555.
- Raspor M., Motyka V., Kaleri A.R., Ninkovic S., Tubic L., Cingel A., Cosic T. Integrating the Roles for Cytokinin and Auxin in De Novo Shoot Organogenesis: From Hormone Uptake to Signaling Outputs // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. Iss. 16.
DOI: 10.3390/ijms22168554.
- 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. Iss. 10. P. 1385–1402.
DOI: 10.1177/1934578X1801301037.
- Salinas-Patino V.A., Espinoza-Mellado M.R., Hernandez-Pimentel M.V., García-Pineda M., Montes-Villafan S., Rodríguez-Dorantes A. Phytohormones Action on *Fouquieria splendens* Callogenesis and Organogenesis Processes // *Int. J. Agricult. Innov. Res.* 2018. V. 7. Iss. 2. P. 2319–1473.
- Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N., Galin I.R., Veselov D.S. Somatic Embryogenesis in Wheat and Barley callus *in vitro* Is determined by the level of Indoleacetic and Abscissic Acids // *Russ. J. Dev. Biol.* 2019. V. 50. No 1. P. 124–135.
DOI: 10.1134/S1062360419030056
- Skoog F., Miller C.O. Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissues Cultured In Vitro // *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1957. V. 11. P. 118–130.

- Smeringai J., Schruppova P.P., Pernisova M. Cytokinins – regulators of *de novo* shoot organogenesis // Front. Plant Sci. 2023. V. 14.
DOI: 10.3389/fpls.2023.1239133.
- Spinoso-Castillo J.L., Bello-Bello J.J. In Vitro Stress-Mediated Somatic Embryogenesis in Plants // Meth. Mol. Biol. 2022. V. 2527. P. 223–235.
DOI: 10.1007/978-1-0716-2485-2_16.
- Vysotskaya L.B., Korobova A.V., Kudoyarova G.R. Abscissic acid accumulation in the roots of nutrient-limited plants: Its impact on the differential growth of roots and shoots // J. Plant Physiol. 2008. V. 165. P. 1274–1279.
DOI: 10.1016/j.jplph.2007.08.014.
- Wang C., Ma H., Zhu W., Zhang J., Zhao X., Li X. Seedling-derived leaf and root tip as alternative explants for callus induction and plant regeneration in maize // Physiol. Plant. 2021. V. 172. Iss. 3. P. 1570–1581.
DOI: 10.1111/ppl.13347.
- Wojcik A.M., Wojcikowska B., Gaj M.D. Current Perspectives on the Auxin-Mediated Genetic Network that Controls the Induction of Somatic Embryogenesis in Plants // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. Iss. 4.
DOI: 10.3390/ijms21041333.
- Yegorova N., Kruglova N., Galin I., Stavtzeva I. Induction of morphogenesis in the callus culture of *Lavandula angustifolia* Mill. // BIO Web Conf. 2020. V. 24.
DOI: 10.1051/bioconf/20202400098

The content of endogenous hormones in explants and calluses of *Lavandula angustifolia* Mill. at the initial stages of *in vitro* culture

N. N. Kruglova^{1, 2, #}, I. R. Galin², N. A. Yegorova¹

¹Research Institute of Agriculture of Crimea, Kievskaya str., 150, Simferopol, 295043 Russia

²Ufa Institute of biology – subdivision of the UfRC RAS, pr. Oktyabrya, 69, Ufa, 450054 Russia

[#]E-mail: kruglova@anrb.ru

The content of endogenous hormones (auxin IAA, cytokinines, ABA) in explants of various types (segments of leaf, bud, stem), primary calluses induced from them, as well as morphogenic and non-morphogenic calluses at the initial stages of *in vitro* culture by the immunoassay method was studied for the first time for *Lavandula angustifolia* Mill. The maximum value of hormone levels in such explants as segments of bud was shown. An increase in the content of hormones in primary calluses was revealed in comparison with similar characteristics in all types of explants. The higher level of the active form of cytokinin (trans-zeatin) and ABA, as well as the lower level of the inactive form of cytokinin (zeatin-nucleotide) and auxin IAA were identified in morphogenic callus compared with non-morphogenic callus. It is suggested that the content of endogenous hormones in explants and calluses of *L. angustifolia* is due to their histological status. The conclusion is made about the unified histophysiological mechanisms of callusogenesis and morphogenesis *in vitro* in the studied plant.

Kew words: callus *in vitro*, morphogenesis, auxin, cytokinin, abscissic acid, *Lavandula angustifolia* Mill.

УДК 577.218

НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В РЕГУЛЯЦИЮ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ, КАК ВОЗМОЖНЫЕ МАРКЕРЫ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ

© 2024 г. г. Л. В. Топчиева*, @, И. В. Курбатова*, О. П. Дуданова**,
А. В. Васильева*, Г. А. Жулай*

*Институт биологии — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”,
ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск, 198910 Россия

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Петрозаводский государственный университет”, ул. Ленина, 33, г. Петрозаводск, 185910 Россия
@E-mail: topchieva67@mail.ru

Поступила в редакцию 10.11.2023 г.

После доработки 09.02.2024 г.

Принята к публикации 09.02.2024 г.

Изложены современные представления о роли некодирующих РНК в регуляции сигнальных путей, контролирующих накопление липидов и развитие воспаления при неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП). Рассмотрен вклад рецепторов активации пролиферации пероксисом (PPAR) в изменение липидного обмена и формирование липотоксичности, как триггерных механизмов НАЖБП. Показана роль TGF β , TNF α /NF- κ B, IL-6/JAK/STAT3 сигнальных путей в активации звездчатых клеток, фиброгенезе печени и прогрессировании НАЖБП. Анализ данных литературы позволил выявить ряд микроРНК и длинных некодирующих РНК (днРНК), экспрессия которых может быть связана с регуляцией этих сигнальных путей при данном заболевании. Вероятно, они могут иметь прогностическое значение для дифференциации клинических форм, тяжести НАЖБП.

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени, некодирующие РНК, сигнальные пути

DOI: 10.31857/S1026347024050023, **EDN:** ulvkn

Развитие патологического процесса в организме человека и животных можно рассматривать как снижение их адаптационных возможностей, которые, в свою очередь, определяются как генетическими, так и эпигенетическими факторами и реализуются на уровне экспрессии генов. Некодирующие РНК играют важную роль в регуляции экспрессии генов, модулируя активность хроматина и уровень мРНК, участвуя в альтернативном сплайсинге. Изменение их количества связано с риском развития большого ряда заболеваний, в том числе и заболеваний печени (Bu *et al.*, 2020; He *et al.*, 2020; Rohilla *et al.* 2022; Zeng *et al.*, 2023). Таким образом, некодирующие РНК могут выступать как терапевтические мишени, а их уровень служить в качестве биомаркеров развития патологических процессов в организме.

Важной составляющей эффективной терапии заболеваний внутренних органов является точная диагностика, основывающаяся не только

на результатах с использованием инструментальных, но и биохимических и молекулярно-генетических методов исследования. Это касается и неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), которая представляет собой широко распространенное хроническое, медленно прогрессирующее метаболическое мультифакториальное заболевание. НАЖБП характеризуется избыточным (>5%) накоплением липидов в печени, с развитием инсулинорезистентности, воспаления и фиброза, и отличается стадийностью течения от стеатоза к стеатогепатиту и циррозу печени. Согласно данным стадиям, выделяют ряд клинко-морфологических форм НАЖБП: стеатоз, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) (с фиброзом или без) и цирроз печени (ЦП) (Лазебник и др., 2021; Powell *et al.*, 2021).

Стеатоз печени является ранней формой НАЖБП и характеризуется доброкачественным клиническим течением. Неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) представляет собой воспалительную

инфильтрацию паренхимы и стромы печени с наличием баллонной дистрофии гепатоцитов и очаговых некрозов. НАСГ является промежуточным и центральным звеном среди последовательных стадий одного патологического процесса (неалкогольного стеатоза и неалкогольного стеатогепатита). Эта клиничко-морфологическая форма НАЖБП отличается прогрессирующим течением с возможным развитием ЦП и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). Уровень смертности среди больных НАЖБП выше, чем в популяции, не только из-за повреждения органа-мишени, но и в связи с сердечно-сосудистыми событиями и онкопатологией (Маевская и др., 2022).

Ключевыми проблемами диагностики НАЖБП являются дифференциация НАСГ от простого стеатоза и выявление фиброза печени. Золотым стандартом решения данных проблем считается биопсия печени, но она имеет серьезные ограничения, которые включают: инвазивность, риск потенциально опасных для жизни осложнений, плохая переносимость, высокая стоимость. Поиск малоинвазивных, высокоспецифических и экономически эффективных биомаркеров НАЖБП является ключевой задачей в диагностике, определении стадии прогрессирования и длительном мониторинге этого заболевания.

В качестве биомаркеров прогрессирования НАЖБП и тяжести данного заболевания могут выступать эндогенные циркулирующие микроРНК (Baffy, 2015; Dongiovanni *et al.*, 2018). Несмотря на активность РНКаз в клетках и неклеточном пространстве, эти молекулы стабильны. Циркулирующие микроРНК могут быть связаны с различными белками и липопротеинами и транспортироваться внутри внеклеточных везикул. МикроРНК регулируют экспрессию генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. Как правило, микроРНК комплементарно связываются с 3'-нетранслируемой областью мРНК (3'НТО) генов-мишеней, что приводит к деградации мРНК или репрессии трансляции (Bartel, 2009). Некоторые микроРНК, напротив, могут стабилизировать мРНК или способствовать трансляции путем связывания с 5'НТО мРНК. МикроРНК могут участвовать в метилировании ДНК через модулирование DNMT (ДНК-метилтрансферазы) напрямую или опосредованно (Tao *et al.*, 2021). Так, мРНК генов *DNMT3a* и *DNMT3b* являются мишенью для микроРНК-125b, 143, 92b, а микроРНК-148a/микроРНК-152 нацелены на мРНК гена *DNMT1* (Tao *et al.*, 2021). МикроРНК также могут влиять на содержание ТЕТ белков (белки, окисляющие 5-метилцитозин в 5-гидроксиметилцитозин) и, соответственно, уровень деметилирования ДНК и экспрессию генов (Lin *et al.*, 2014). Так, оказалось, что экспрессия гена *TET1*, который может функционировать как супрессор опухоли, снижена при ГЦК. Транскрипты

этого гена являются мишенью для микроРНК-29b (Lin *et al.*, 2014).

Экспрессия микроРНК-122, микроРНК-34a и микроРНК-16 значительно выше у пациентов с НАЖБП и коррелирует с тяжестью заболевания (Cermelli *et al.*, 2011). Интересно, что уровень микроРНК-122 у мышей с экспериментально вызванным стеатозом повышался при отсутствии изменений АЛТ в сыворотке, что позволяет предположить, что уровни микроРНК-122 в сыворотке могут фактически служить биомаркером для обнаружения ранней стадии НАЖБП (Yamada *et al.*, 2015).

Другие молекулы, которые потенциально могут иметь прогностическое и клиническое значение при НАЖБП – длинные некодирующие РНК (днРНК). Уровень экспрессии днРНК у человека имеет клеточную и тканевую специфичность (Rohilla *et al.*, 2022). ДнРНК включают разнообразный класс РНК, а именно длинные межгенные РНК (lincRNA), антерсенные РНК (eRNAs) и смысловые или антисмысловые транскрипты (AS) (Rohilla *et al.*, 2022). Они выполняют различные функции, включая регуляцию транскрипции в цис- или транс-положении, формирование/организацию ядерного домена, регуляцию функции и стабильности белка, уровня микроРНК через их связывание или, по-другому, «спонжирования» (конкурентные РНК). Они могут кодировать малые белки или пептиды. Использование метода Microarray позволило выявить вовлечение 3111 днРНК (1915 с повышенной экспрессией и 1196 с пониженной экспрессией) в патогенез НАЖБП у мышей (Ye *et al.*, 2021a). Обнаружены различия в уровне днРНК между контрольной группой мышей и животными с экспериментально вызванным НАСГ. Выявлены 1394 днРНК с повышенной экспрессией и 1283 днРНК со сниженным уровнем экспрессии. Были также выявлены отличия между группами НАСГ и НАЖБП: обнаружено 1513 днРНК с увеличением и 1824 днРНК с понижением их количества. В настоящее время опубликованы многочисленные обзоры, посвященные роли днРНК в этиологии и патогенезе заболеваний печени (Bu *et al.*, 2020; He *et al.*, 2020; Rohilla *et al.*, 2022; Zeng *et al.*, 2023).

Представляет особый интерес поиск некодирующих РНК, уровень которых ассоциирован со степенью фиброза, что могло бы помочь в прогнозировании исхода заболевания. Формирование фиброза печени в основном обусловлено активацией звездчатых клеток печени (ЗКП) и дисбалансом производства и деградации внеклеточного матрикса (ВКМ) (Циммерман, 2017). Leti и соавторы (Leti *et al.*, 2017) идентифицировали изменение профиля экспрессии 4057 длинных некодирующих РНК в тканях печени пациентов НАСГ, имеющих гистологические признаки развитого фиброза печени по сравнению с пациентами без признаков фиброза и лобулярного воспаления. У пациентов

и у экспериментальных животных с НАСГ при фиброзе наблюдается изменение экспрессии днРНК GAS5 (growth arrest-specific transcript) (Yu, *et al.*, 2015a; Han *et al.*, 2020) H19 (Di Mauro *et al.*, 2021), HULC (highly upregulated in liver cancer) (Shen *et al.*, 2019), HOTAIR (Homeobox (HOX) transcript antisense RNA) (Yu *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2023), MALAT1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1) (Shu *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022), NEAT1 (nuclear enriched abundant transcript 1) (Wang *et al.*, 2021a), MEG3 (maternally expressed gene 3) (Qin *et al.*, 2021). Транскрипт 5, специфичный для остановки роста (GAS5), действует как важный медиатор в контроле клеточной пролиферации и роста. Сведения о роли этой днРНК в фиброгенезе печени противоречивы. Так, показано, что экспрессия GAS5 снижена в образцах фиброзной печени мышей, крыс и человека, а также в активированных звездчатых клетках печени (Yu *et al.*, 2015a). Сверхэкспрессия GAS5 подавляла активацию первичных ЗКП *in vitro* и уменьшала накопление коллагена в фиброзных тканях печени *in vivo* (Yu *et al.*, 2015a). GAS5 является мишенью для микроРНК-222, в то же время микроРНК-222 может ингибировать экспрессию GAS5, связываясь с ней напрямую. Усиление экспрессии GAS5, которая функционирует в качестве конкурирующей эндогенной РНК для микроРНК-222, способствует повышению уровня белка p27, ингибируя тем самым активацию и пролиферацию ЗКП. В то же время имеются данные о том, что уровень экспрессии GAS5 в плазме пациентов с НАЖБП может повышаться или снижаться у пациентов с разной степенью фиброза (Han *et al.*, 2020). У пациентов с F3 стадией количество этой днРНК было значимо выше, чем у пациентов с F2 и F4 стадиями фиброза и циррозом печени. При этом, содержание GAS5 в плазме крови и в печени не зависело от тяжести НАСГ (тяжелая и нетяжелая форма согласно оценке активности НАЖБП (NAS). В плазме крови пациентов с фиброзом печени по сравнению со здоровыми индивидами обнаружено снижение уровня MEG3 (Qin *et al.*, 2021). Как оказалось, уровень этой днРНК отрицательно коррелирует со степенью фиброза. Повышенная экспрессия MEG3 в клетках LX-2 (звездчатые клетки человека) способствует снижению активации звездчатых клеток. Данная днРНК «спонжирует» участвующую в регуляции PPAR γ (гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом) микроРНК-145. MEG3 может ингибировать активацию звездчатых клеток печени и ускорять реверсию фиброза печени также путем нацеливания на ген *NLR5*, кодирующий NOD-подобный рецептор C5 (Wu *et al.*, 2021). *NLR5* является высококонсервативным членом семейства цитоплазматических рецепторов NLR, участвует в воспалении и иммунных реакциях, регулируя различные сигнальные пути, такие как NF- κ B (ядерный фактор каппа В), активация которого

усиливает воспалительные реакции и фиброз печени (Zhang *et al.*, 2019a). Со степенью фиброза положительно коррелирует плазменный уровень днРНК MALAT1 (Wang *et al.*, 2022).

Прогрессирование фиброза также связано с нарушением регуляции экспрессии микроРНК. Экспрессия микроРНК-21, микроРНК-222, микроРНК-221, микроРНК-199a и микроРНК-17-5p усиливается при активации ЗКП (Ogawa *et al.*, 2012; Lino Cardenas *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2015b). В тканях печени больных НАЖБП с фиброзом (F3-F4) наблюдается сверхрегуляция уровней микроРНК-182, -31, -183, -224, -150, -200a, -92b (Leti *et al.*, 2015). В то же время, экспрессия микроРНК-590, -378i, -17, -219a у этих пациентов снижена по сравнению с больными НАЖБП без признаков фиброза. Также при прогрессировании фиброза печени выявлено снижение уровня микроРНК-19b, микроРНК-15b, микроРНК-16, микроРНК-150 и микроРНК-29a/b (Guo *et al.*, 2009; Estep *et al.*, 2010; Lakner *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2014).

Предпринимаются попытки связать клинические показатели при НАЖБП с уровнем не отдельных некодирующих РНК, а в комплексе, что обусловлено их регуляторными функциями. Так, в работе Albadawy и соавторов была предпринята попытка оценки экспрессии панели циркулирующих РНК при НАЖБП/НАСГ без подозрения на прогрессирующий и с подозрением на прогрессирующий фиброз (Albadawy *et al.*, 2021a). Обнаружено усиление экспрессии РНК, регулирующих эндотелин 1, в группе пациентов с НАЖБП/НАСГ по сравнению со здоровыми людьми. Авторы предложили использовать панель РНК *EDN1/TNF/MAPK3/EP300/hsa-miR-6888-5p/lncRNARABGAPIL-DT-206* в качестве маркеров НАЖБП/НАСГ, а также для разграничения НАЖБП/НАСГ (F1, F2) от поздних стадий фиброза (F3, F4) (Albadawy *et al.*, 2021a). Эта же группа авторов (Albadawy *et al.*, 2021b) предложила использовать и другую панель РНК *HSPD1/MMP14/ITGB1/miR-6881-5P/Lnc-SPARCL1-1:2*, связанную с регуляцией мРНК гена белка теплового шока HSPD1 (или иначе HSP60), который представляет собой хорошо охарактеризованный митохондриальный шаперон. Его основные функции заключаются в сохранении целостности клеточных белков. *HSPD1* действует как важный регулятор продукции цитокинов и взаимодействует с регуляторным фактором интерферона 3 (IRF3), который играет роль в регуляции сигнального пути NLR и IFN- β . Экспрессия мРНК *HSPD1* у пациентов с НАСГ отличалась от экспрессии у здоровых людей. Также обнаружены различия в уровне транскриптов этого гена у пациентов с НАЖБП без стеатоза, с простым стеатозом и НАСГ (Albadawy *et al.*, 2021b). Содержание транскриптов *HSP60* регулируется днРНК SPARCL1-1:2 и микроРНК 6881-5p.

**Сигнальные пути,
опосредованные активацией PPAR**

В основе патогенеза НАЖБП лежит воспаление, цитотоксическое действие избытка свободных жирных кислот и их метаболитов, формирование инсулинорезистентности. Липотоксичность, как один из триггерных факторов патогенеза НАЖБП, связана с активацией рецепторов активатора пролиферации пероксисом (PPAR) – PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ . Они представляют собой ядерные рецепторы гормонов, регулирующие обмен углеводов и липидов, гомеостаз глюкозы. Свои функции PPAR выполняют посредством контроля экспрессии генов, кодирующих белки, связанные с окислением жирных кислот, такие как средне-цепочечная ацил-КоА-дегидрогеназа и карнитин-пальмитоилтрансфераза-1 (Puengel *et al.*, 2022). Рецепторы активатора пролиферации пероксисом присутствуют в иммунных и паренхиматозных клетках печени (гепатоцитах, ЗКП, макрофагах, дендритных клетках и Т-клетках), активируются при избыточном накоплении липидов и желчных кислот. Активность PPAR α связана с высокой способностью к окислению жирных кислот в клетках различных тканей организма. PPAR α может регулировать выработку жира в печени посредством активации белка 1c, связывающего регуляторный элемент стерола (SREBP1c), или косвенно координируя его через сигнальный путь LXR (X-рецепторы печени). В обзорной статье Puengel и соавторов приводятся данные литературы, свидетельствующие о том, что активация PPAR α происходит уже на ранних стадиях НАЖБП, а экспрессия гена *PPAR α* в печени коррелирует с тяжестью и ответом на лечение пациентов с НАСГ (Puengel *et al.*, 2022). PPAR α преимущественно участвует в повышении уровня экспрессии генов печени, связанных с глюконео- и кетогенезом, митохондриальным и пероксисомальным β -окислением, а также связыванием и транспортировкой жирных кислот (Gross *et al.*, 2017). Таким образом, активность сигнального пути PPAR α связана с защитой клеток печени от избытка липидов и ЖК. Помимо своих противовоспалительных свойств, PPAR α также играет важную роль в защите печени путем регуляции фактора роста фибробластов 21 (FGF21). FGF21 может улучшить системную чувствительность к инсулину и замедлить фиброз печени. PPAR β/δ способствует β -окислению жирных кислот во внепеченочных тканях, преимущественно экспрессируется в жировой ткани, действуя как сенситизатор инсулина, и предотвращает накопление жира путем индукции образования триглицеридов свободных жирных кислот (Fuchs *et al.*, 2016). В печени PPAR β/δ экспрессируется в гепатоцитах, ЗКП и клетках Купфера, таким образом участвуя в регуляции воспаления и фиброгенеза при

НАСГ (Staels *et al.*, 2013). Активация PPAR β/δ играет роль в гепатопротекции через ряд механизмов, например, посредством ингибирования SREBP1c, регуляции рецепторов липопротеинов низкой плотности (Puengel *et al.*, 2022).

Описаны две изоформы PPAR γ , PPAR γ 1 и PPAR γ 2, транслируемые с четырех альтернативно сплайсируемых мРНК гена *PPARG* (Zaiou *et al.*, 2023). Изоформа PPAR γ 1 экспрессируется в печени и других тканях, тогда как изоформа PPAR γ 2 экспрессируется исключительно в жировой ткани, где она регулирует адипогенез и липогенез. PPAR γ регулирует множество процессов в гепатоцитах, резидентных макрофагах печени (клетках Купфера) и звездчатых клетках печени (Skat-Rørdam *et al.*, 2019). При НАСГ повреждение печени, вызванное избытком липидов и гибелью гепатоцитов, запускает активацию клеток Купфера, что приводит к секреции ими провоспалительных цитокинов и хемокинов и усилению рекрутирования моноцитов из кровотока (Wang and Gao, 2021). Активация ЗКП способствует процессам фиброгенеза (Циммерман, 2017). Следовательно, PPAR γ может играть значительную роль в патогенезе НАЖБП. Об этом свидетельствуют факты увеличения экспрессии гена *PPARG* в печени у пациентов с НАЖБП (Pettinelli, Videla, 2011). Патогенетическая или, напротив, защитная роль активации этого рецептора, по-видимому, определяется типом клеток печени, в которых он экспрессируется (Lee *et al.*, 2023). В гепатоцитах PPAR γ активируется поступающими жирными кислотами и накопленными липидами и может опосредовать индукцию стеатогенных механизмов, способствуя усилению продукции «молекул опасности» (DAMP) для активации других (непаренхиматозных) клеток печени. В гепатоцитах PPAR γ способствует усилению экспрессии генов *ADIPOQ* (адипонектин), *FSP27* (белок липидных капель), *CD36* (белок семейства В сквэнджер-рецепторов), *LOC112043943* (ацил-КоА дельта(9)десатуразы) и других ферментов синтеза жирных кислот, способствуя адипогенной трансформации гепатоцитов (Yu *et al.*, 2003). PPAR γ может регулировать активность ЗКП, процессы эпителиально-мезенхимального перехода и фиброгенеза печени (Morán-Salvador *et al.*, 2013). Показано, что у мышей с делецией гена *Pparg* в макрофагах и ЗКП наблюдались более выраженные симптомы воспаления и фиброза печени, что предполагает противовоспалительные и антифиброгенные свойства этого ядерного рецептора в непаренхиматозных клетках печени (Morán-Salvador *et al.*, 2013). Полученные к настоящему моменту данные свидетельствуют о том, что усиление экспрессии *Pparg* способствует накоплению липидов в печени, синтезу и поглощению ЖК. Так, нокаут PPAR γ предотвращал развитие стеатоза у мышей, получавших питание с высоким содержанием жиров, а также у мышей дефицитных

по лептину (Morán-Salvador *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2020). С другой стороны, активация PPAR γ в макрофагах способствует переключению противовоспалительного фенотипа за счет повышения регуляции генов *MRC1* (*CD206*) (маннозный рецептор) и *CD163* (скавенджер-рецептор), ингибированию секреции провоспалительных факторов (Zizzo, Cohen, 2015).

В регуляции экспрессии гена *PPARG* при НАЖБП участвуют некодирующие РНК (табл. 1). К настоящему моменту опубликованы обзорные

статьи, посвященные роли эпигенетических механизмов в модулировании уровня транскриптов этого гена (Skat-Rørdam *et al.*, 2019; Zaiou, 2023). Выявлен ряд микроРНК, взаимодействующих с мРНК гена *PPARG* и способствующих снижению ее уровня при НАЖБП. МикроРНК-27a и микроРНК-27b нацелены на 3'НТО мРНК *PPARG* (Kim *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2018). Оказалось, усиление экспрессии микроРНК-34a и микроРНК-34с способствует активации ЗКП путем нацеливания

Таблица 1. Некодирующие РНК, вовлеченные в регуляцию сигнальных путей при НАЖБП и фиброзе печени

Некодирующая РНК	Мишень	Функции	Ссылка
Сигнальные пути, опосредованные активацией PPAR			
МикроРНК27a и микроРНК27b	Нацелены на 3'НТО мРНК <i>PPARγ</i>	Взаимодействуют с мРНК гена <i>PPARγ</i> и способствуют снижению ее уровня при НАЖБП	Kim <i>et al.</i> , 2010
МикроРНК-34a и микроРНК-34с	мРНК гена <i>PPARγ</i>	Усиление экспрессии способствует активации ЗКП	Li <i>et al.</i> , 2015
МикроРНК-30a-3p	мРНК <i>PPARA</i>	Сверхэкспрессия способствует повышению содержания липидных капель и триглицеридов	Wang <i>et al.</i> , 2020
МикроРНК-3666	мРНК <i>PPARG</i>	Усиление экспрессии в гепатоцитах может способствовать ослаблению признаков стеатоза	Mittal <i>et al.</i> , 2020
ДнРНК MEG3,	МикроРНК-145	Участвует в регуляции активности PPAR γ	Qin <i>et al.</i> , 2021
ДнРНК HС	микроРНК-130-3p/ PPAR	Регулирует накопление липидных капель в печени	Lan <i>et al.</i> , 2019
ДнРНК H19	МикроРНК130a/ PPAR	Сверхэкспрессия стеатозу посредством усиления накопления липидов в печени и липогенеза	Liu <i>et al.</i> , 2019
TGF β сигнальный путь			
ДнРНК PCAT6	микроРНК-185-5p	Активирует путь TGF β	Zhu <i>et al.</i> , 2020
ДнРНК NEAT1	МикроРНК-339-5p, микроРНК-139-5p	модулирует активность TGF β сигнального пути, может вовлекаться в процессы фиброгенеза печени, регулируя β -катенин/SOX9/TGF β 1 сигнальный путь, может непосредственно подавлять экспрессию микроРНК-139-5p, способствуя активации ЗКП и усугубляя фиброз печени	Zhang <i>et al.</i> , 2019b; Wang <i>et al.</i> , 2021a
ДнРНК LFAR1	Smad 2/3	Lnc-LFAR1 способствует связыванию Smad2/3 с TGF β R1 и его фосфорилированию в цитоплазме. Lnc-LFAR1 связывается непосредственно с Smad2/3 и способствует транскрипции <i>TGFβ</i> , <i>SMAD2</i> , <i>SMAD3</i> , <i>NOTCH2</i> и <i>NOTCH3</i> , что, в свою очередь, приводит к образованию TGF β .	Zhang <i>et al.</i> , 2017
ДнРНК MALAT1	МикроРНК-125b, микроРНК-203a	Конкурирующая эндогенная РНК (ceRNA), взаимодействующая с микроРНК-125b и микроРНК-203a, которые были идентифицированы как два новых отрицательных регулятора передачи сигналов TGF β	Zhang <i>et al.</i> , 2020

Продолжение таблицы 1

Некодирующая РНК	Мишень	Функции	Ссылка
ДнРНК NOTIP	МикроРНК-148a	Негативно регулирует экспрессию микроРНК-148a в ЗКП мышей	Li <i>et al.</i> , 2018
ДнРНК LINC00663	Hsa-miR-3916	Регулирует ЭМП и миграцию LX-2 клеток, регулирует процессы фиброгенеза через конкурентное связывание («споживание») Hsa-miR-3916.	Chu <i>et al.</i> , 2023
МикроРНК-101	<i>TβRI, KLF6</i>	Супрессор передачи сигналов TGFβ	Tu <i>et al.</i> , 2014
МикроРНК-130a-3p	<i>TGFBR1, TGFB2</i>	Отрицательная регуляция активации и пролиферации звездчатых клеток печени при прогрессировании неалкогольного стеатогепатита путем прямого действия на гены-мишени <i>TGFBR1</i> и <i>TGFB2</i> (кодирующие рецепторы TGFβ) через сигнальный путь TGFβ/SMAD	Wang <i>et al.</i> , 2017
МикроРНК-125b, микроРНК-203a	<i>TGFBR1</i> и <i>TGFB2</i>	Отрицательная регуляция передачи сигналов TGFβ	Zhang <i>et al.</i> , 2020
МикроРНК-148a	<i>TGFBR1</i> и <i>TGFB2</i>	Негативное влияние на активацию ЗКП путем нацеливания на <i>TGFBR1</i> и <i>TGFB2</i> .	Li <i>et al.</i> , 2018
Hsa-miR-3916	SF2	Участвует в контроле альтернативного сплайсинга пре-мРНК <i>FN</i> (фибронектина) через связывание с фактором сплайсинга 2 (SF2). При альтернативном сплайсинге пре-мРНК <i>FN</i> образуются такие варианты, как дополнительный домен A-FN (EDA-FN), который имеет решающее значение при фиброзе	Mòdol <i>et al.</i> , 2015
МикроРНК-139-5p	<i>CTNNB1</i> ,	Способствует активации ЗКП и усугубляя фиброз печени	Wang <i>et al.</i> , 2021a
МикроРНК-34a	<i>TGIF2</i>	Регуляция TGFβ1 сигнального пути, усиление процессов ЭМП и повышение уровня маркеров фиброза, активирует рецептор трансформирующего фактора роста-бета типа 1 (TβR1), TGFβ1 и p-smad2/3, способствует усилению продукции воспалительных цитокинов IL-6 и IL-17	Pan <i>et al.</i> , 2021
Сигнальный путь TNFα /NF-κB			
МикроРНК-378	<i>Prkag2</i>	Усиление экспрессии микроРНК-378 способствует снижению уровня транскриптов гена <i>Prkag2</i> , кодирующего АМР активированную протеин киназу γ2 (АМРКγ2), снижению деацетилазной активности сиртуина, повышению активности NF-κB и усилению экспрессии гена <i>TNF</i> .	Zhang <i>et al.</i> , 2019c
ДнРНК-gm9795	<i>IRE1α, BIP</i>	Способствует воспалительной реакции при НАСГ, активируя экспрессию генов, кодирующих маркерные белки стресса эндоплазматического ретикула <i>IRE1α</i> , <i>BIP</i> и экспрессию генов провоспалительных цитокинов через пути NF-κB и JNK	Ye <i>et al.</i> , 2021a

Окончание таблицы 1

Некодирующая РНК	Мишень	Функции	Ссылка
MALAT1	МикроРНК-181a	MALAT1 модулирует активацию звездчатых клеток печени посредством регуляции оси микроРНК-181a/TLR4/NF- κ B, тем самым способствуя развитию фиброза печени	Wang <i>et al.</i> , 2021b
ДнРНК TNF	<i>A20, NFKBIA</i>	Нокаут lncTNF в клетках HepG2 снижает активность транскрипционного фактора NF- κ B и подавляет экспрессию генов-мишеней <i>A20</i> и <i>NFKBIA</i>	Atanasovska <i>et al.</i> , 2021
МикроРНК-125b	<i>TNFAIP3</i>	Сверхэкспрессия микроРНК-125b способствует усилению процессов фосфорилирования I κ B α и p65 и секреции воспалительных факторов, также способствует NF- κ B-опосредованному воспалительному ответу при НАЖБП путем прямого нацеливания на ген <i>TNFAIP3</i> , кодирующий фактор некроза опухоли альфа-индуцированный белок 3 или A20	Zhang <i>et al.</i> , 2021
МикроРНК-155	<i>C/EBPβ</i> и <i>SOCS1</i>	Экспериментально подтверждены мишени <i>C/EBPβ</i> и <i>SOCS1</i> . Дефицит микроРНК-155 у нокаутных мышей ослаблял стеатоз и фиброз печени, вызванные диетой с дефицитом метионина-холина, без уменьшения воспаления	Faraoni <i>et al.</i> , 2009; Csak <i>et al.</i> , 2015
IL-6/JAK/STAT3 сигнальный путь			
МикроРНК-200a-3p	мРНК гена <i>STAT3</i>	Повышенная экспрессия может способствовать снижению уровня мРНК гена <i>STAT3</i> и, вероятно, активности IL-6/JAK/STAT3 сигнального пути	Ye <i>et al.</i> , 2021b
МикроРНК-148.	мРНК гена <i>KLF6</i>	Способна снижать соотношение про- и противовоспалительных макрофагов печени, и таким образом, способствовать снижению фибротических процессов в этом органе	Tian <i>et al.</i> , 2022
МикроРНК-21	PPARA	Является частью регуляторной сети, которая модулирует фиброгенез печени, участвует в активации воспаления печени (или НАСГ) за счет увеличения экспрессии генов провоспалительных белков через сигнальный путь STAT3, через сигнальные пути TGF β /Smad3/Smad7 вызывает активацию звездчатых клеток (HSC), отложение коллагена и фиброз печени, повышенный уровень экспрессии микроРНК-21 связывают с развитием стеатоза	Qian <i>et al.</i> , 2015; Belloni <i>et al.</i> , 2018; Lai <i>et al.</i> , 2021

на мРНК гена *PPARG*. Таким образом, члены семейства микроРНК-34 могут участвовать в фиброзе печени через пути PPAR (Li *et al.*, 2015). Усиление экспрессии микроРНК-30a-3p в гепатоцитах может способствовать накоплению липидных капель

и триглицеридов (Wang *et al.*, 2020). мРНК PPARA является мишенью для микроРНК-30a-3p. Напротив, повышение уровня микроРНК-3666 ослабляет признаки стеатоза путем нацеливания на мРНК *PPARG* (Mittal *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020).

Важную роль в регуляции метаболизма триглицеридов, холестерина и липопротеинов при НАЖБП играют днРНК. Выявлены днРНК, взаимодействующие с PPAR. Как уже было указано выше, в регуляции активности PPAR γ участвует днРНК MEG3, контролирующая уровень микроРНК-145 (Qin *et al.*, 2021). ДнРНК из гепатоцитов lnc-NC участвует в накоплении липидных капель в печени через путь микроРНК-130-3p/PPAR (Lan *et al.*, 2019). Как показано в экспериментах с мышами, находившимися на высокожировой диете, и гепатоцитами, обработанными раствором свободных жирных кислот, сверхэкспрессия днРНК H19 способствует стеатозу посредством усиления накопления липидов в печени и липогенеза через ось микроРНК130a/PPAR (Liu *et al.*, 2019). В регуляции активности PPAR участвует днРНК-активатор стероидных рецепторов РНК (SRA) (Xu *et al.*, 2010). Как оказалось, при НАЖБП активируется консервативный сигнальный путь Hedgehog (Hh) (Guy *et al.*, 2012; Kwon *et al.*, 2016), играющий важную роль в метаболизме липидов в печени и связанных с ним заболеваниях посредством прямой регуляции ранее не охарактеризованной днРНК, называемой длинной некодирующей РНК, индуцированной передачей сигналов Hedgehog (Hilnc) (Jiang *et al.*, 2021). Ингибирование сигнального пути Hh переводит миофибробласты в состояние покоя, тем самым снижая содержание их в печени и ослабляя фиброз (El-Agroudy *et al.*, 2016). Было обнаружено, что Hilnc контролирует стабильность мРНК PPAR путем прямого взаимодействия с IGF2BP2 (белок 2, связывающий мРНК инсулиноподобного фактора роста 2). Таким образом, микроРНК и днРНК, контролирующие уровень транскриптов гена PPAR, могут быть вовлечены не только в регуляцию накопления липидов и жиров в гепатоцитах (как триггерного фактора стеатоза), но и фиброгенеза при НАЖБП.

В прогрессировании неалкогольного стеатогепатита (от стеатоза до фиброза и цирроза печени) важную роль играет воспаление, которое реализуется за счет активации резидентных иммунных клеток печени, в частности клеток Купфера, и усиления миграции в ткани органа дендритных клеток, нейтрофилов, активированных Т-лимфоцитов. Цитокины опосредуют ответ клеток на воспаление, запуская сигнальный каскад, направленный на активацию транскрипционных факторов, регулирующих рост, пролиферацию, дифференцировку и выживание гепатоцитов. Среди наиболее важных сигнальных путей, контролирующих процессы воспаления печени, эпителиально-мезенхимального перехода, выживания или повреждения гепатоцитов – TGF β , IL-6/JAK/STAT3 и TNF/TNFR сигнальные пути. Активность сигнальных путей при воспалении определяется также эпигенетическими факторами. В настоящее время имеется экспериментальный

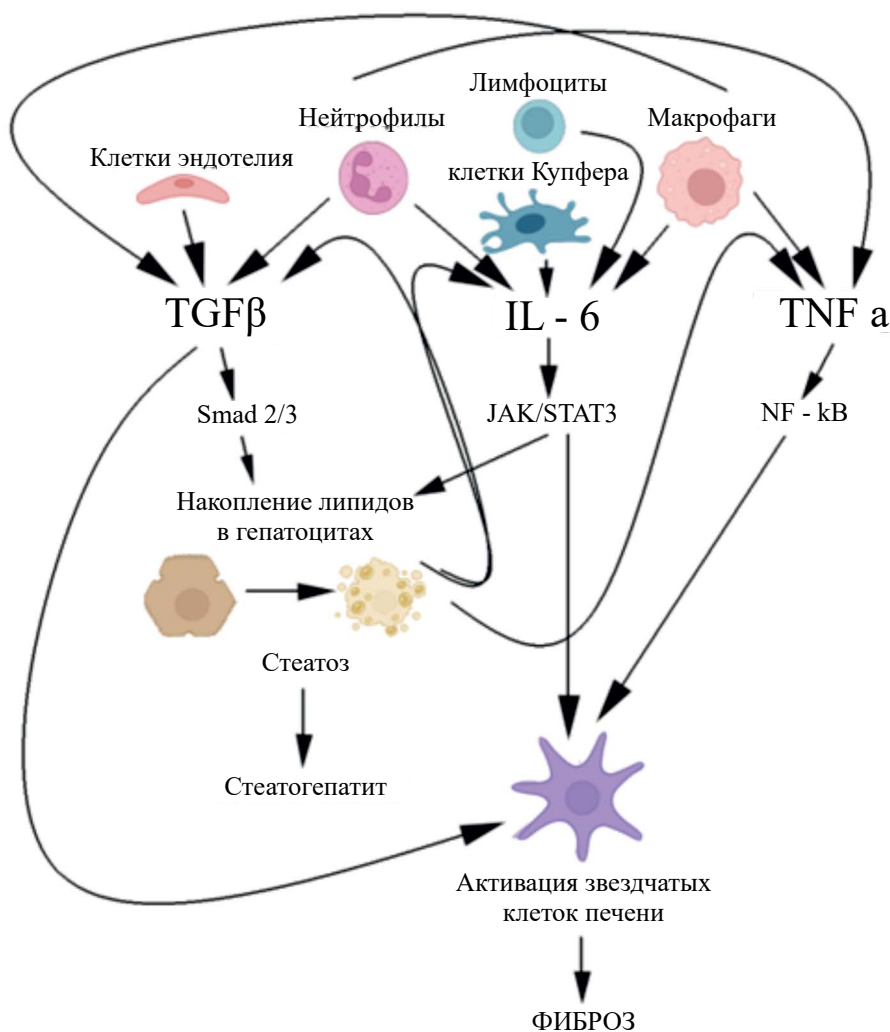
материал, свидетельствующий о вовлечении некодирующих РНК в регуляцию экспрессии генов, контролирующих воспаление, фиброз и цирроз печени, в том числе TGF β , IL-6/JAK/STAT3 и TNF α /TNFR сигнальные пути (рис. 1, табл. 1).

TGF β сигнальный путь

Звездчатые клетки печени, гепатоциты и некоторые другие клетки подвергаются эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП) в ответ на повреждение печени и воспалительные стимулы, что способствует отложению внеклеточного матрикса (ВКМ) и развитию фиброза. Так, показано, что обработка сфероидов на основе клеток печени человека HepG2/C3A растворами олеиновой и пальмитиновой кислот индуцировала процессы, характерные при НАЖБП (накопление внутриклеточных липидов и повышение содержания АТФ) (Frandsen *et al.*, 2022). При этом отмечена активация транскрипции генов, кодирующих белковые факторы ЭМП (Frandsen *et al.*, 2022). Например, ЭМП сопровождается усилением экспрессии генов факторов транскрипции, таких как *Snail*, *Twist* и *ZEB*, снижением содержания белков межклеточных соединений, таких как Е-кадгерин, CAR, клаудины, окклюдины и ZO-1, и активацией синтеза виментина, фибронектина, и N-кадгерина (Kalluri, Weinberg, 2009; Thiery *et al.*, 2009). МикроРНК, такие как микроРНК-200a и микроРНК-141, также способны регулировать ЭМП (Chen *et al.*, 2020).

Трансформирующий фактор роста- β (TGF β) является одним из основных регуляторов ЭМП. В каноническом пути TGF β связывается с рецепторами серин/треонинкиназы типа I и типа II (T β RI и T β RII) на клеточной поверхности. Активированный T β RI фосфорилирует белки R-Smad, Smad2 и Smad3, которые собираются в гетеромерные комплексы с Co-Smad4 (Hata, Chen, 2016; Tzavlaki, Moustakas, 2020). Этот путь регулирует содержание факторов транскрипции, участвующих в ЭМП, включая *Snail*, *ZEB* и *Twist*. В неканоническом пути TGF β стимулирует различные альтернативные сигнальные пути, такие как митоген-активируемая протеинкиназа (МАРК), малые ГТФазы, фосфоинозитид-3-киназа (PI3K)/Akt и ядерный фактор κ B (NF- κ B) для регуляции экспрессии генов, связанных с ЭМП. В условиях воспалительной микросреды TGF β может ускорять прогрессирование ЭМП. Выяснилось, что члены семейства микроРНК-101 действуют как супрессоры передачи сигналов TGF β , нацеливаясь на T β RI и Krippel-подобный фактор 6 (KLF6), в процессе фиброгенеза печени (Tu *et al.*, 2014).

Wang и соавторы (Wang *et al.*, 2017) показали, что микроРНК-130a-3p может играть роль в регуляции активации и пролиферации звездчатых клеток печени при прогрессировании неалкогольного



Сигнальные пути, опосредованные TGFβ, IL-6/JAK/STAT3 и TNFα/TNFR, как участники прогрессирования НАЖБП

стеатогепатита путем прямого действия на гены-мишени *TGFBR1* и *TGFBR2* (кодирующие рецепторы TGFβ) через сигнальный путь TGFβ/SMAD. Сверхэкспрессия микроРНК-130a-3р в звездчатых клетках ингибировала их активацию и пролиферацию, что сопровождалось снижением содержания на поверхности клеток *TGFBR1*, *TGFBR2*, активности Smad2, Smad3, матриксной металлопротеиназы-2 (ММП-2), ММП-9, и уровня коллагена 1 и 4 типов (Wang *et al.*, 2017). Известно, что днРНК PCAT6 способствует повышению экспрессии генов *TGFBR1* и *TGFBR2* и активирует путь TGFβ посредством спонжирования микроРНК-185-5р (Zhu *et al.*, 2020). ДнРНК ядерно-обогащенный обильный транскрипт 1 (NEAT1) также может участвовать в модулировании активности TGFβ сигнального пути, «спонжируя» микроРНК-339-5р, функциональной мишенью которой является мРНК гена *TGFB1* (Zhang *et al.*, 2019b). Транскрипт 1 метастаз-ассоциированной аденокарциномы легкого

(MALAT1) функционирует как конкурирующая эндогенная РНК (ceRNA), взаимодействующая с микроРНК-125b и микроРНК-203a, которые были идентифицированы как два новых отрицательных регулятора передачи сигналов TGFβ путем нацеливания на *TGFBR1* и *TGFBR2* (Zhang *et al.*, 2020). В тканях печени и звездчатых клетках печени мышей, которым внутривенно вводили тетрахлорметан (CCl₄), в значительной степени индуцировалась экспрессия днРНК HOTTIP, которая, в свою очередь, ингибировала экспрессию микроРНК-148a (Li *et al.*, 2018). В данном исследовании показано, что микроРНК-148a оказывает негативное влияние на активацию ЗКП путем нацеливания на мРНК *TGFBR1* и *TGFBR2*. Длинная некодирующая РНК AK002107 отрицательно модулирует микроРНК-140-5р и нацеливается на мРНК *TGFBR1*, чтобы индуцировать эпителиально-мезенхимальный переход при гепатоцеллюлярной карциноме (Tang *et al.*, 2019). У мышей при индуцированном CCl₄

фиброзе печени днРНК *LFAR1* регулирует процессы фиброгенеза, связываясь непосредственно с *Smad2/3*, что способствует транскрипции *TGFβ*, *Smad2*, *Smad3*, *Notch2* и *Notch3* и образованию *TGFβ* (Zhang *et al.*, 2017). Функциональное выключение днРНК *LFAR1* посредством *LFAR1-shRNA* снижает *TGFβ*-индуцированный апоптоз гепатоцитов *in vitro* и ослабляет фиброз печени, вызванный *CCl4* и лигированием желчных протоков у мышей (Zhang *et al.*, 2017).

В фиброзе печени, опосредованном активацией *TGFβ* сигнального пути в ЗКП, вероятно, играет роль днРНК *LINC00663* (Chu *et al.*, 2023). Так, обработка звездчатых клеток человека *LX-2* раствором *TGFβ1* (10 ng/ml) в течение 48 часов индуцировала усиление в них экспрессии *LINC00663*. В работе Chu с соавторами показано, что эта днРНК регулирует ЭМП и миграцию *LX-2* клеток (Chu *et al.*, 2023). Наблюдается увеличение ее уровня в тканях печени мышей с экспериментально вызванным холестазным фиброзом. Как оказалось, *LINC00663* регулирует процессы фиброгенеза через конкурентное связывание («спожирание») *Hsa-miR-3916*. В свою очередь, *Hsa-miR-3916* участвует в контроле альтернативного сплайсинга пре-мРНК *FN* (фибронектина) через связывание с фактором сплайсинга 2 (*SF2*). При альтернативном сплайсинге пре-мРНК *FN* образуются такие варианты, как дополнительный домен A-*FN* (*EDA-FN*), увеличение содержания которого имеет значение для усиления фиброза (Möddol *et al.*, 2015).

ДнРНК *NEAT1* также может вовлекаться в процессы фиброгенеза печени, регулируя β-катенин/*SOX9/TGFβ1* сигнальный путь (Wang *et al.*, 2021a). Ранее была выяснена патогенетическая роль повышенной экспрессии β-катенина в фиброгенезе, обусловленная его стимулирующим эффектом на экспрессию гена *SOX9*, кодирующего одноименный транскрипционный фактор (Cui *et al.*, 2021). ДнРНК *NEAT1* может непосредственно подавлять экспрессию микроРНК-139-5p, которая в свою очередь нацелена на мРНК *CTNNB1*, таким образом, способствуя активации ЗКП и усугубляя фиброз печени (Wang *et al.*, 2021a).

Получены сведения о роли микроРНК-34a в регуляции *TGFβ1* сигнального пути (Song *et al.*, 2019; Pan *et al.*, 2021). Оказалось, что микроРНК-34a сверхэкспрессирована в периферической крови у пациентов с первичным билиарным холангитом. Повышенная экспрессия микроРНК-34a в клетках *HIBEC* (клетки эпителия желчных протоков человека) способствует усилению процессов ЭМП и повышению уровня маркеров фиброза. Как оказалось, усиление экспрессии микроРНК-34a связано с активацией *TβR1*, *TGFβ1* и p-SMAD2/3, усилением продукции воспалительных цитокинов *IL-6* и *IL-17* (Pan *et al.*, 2021). Показано, что микроРНК-34a способствует ЭМП и фиброзу

печени при первичном билиарном холангите путем нацеливания на мРНК гена антагониста пути *TGFβ1/SMAD – TGIF2* (кодирующий ДНК-связывающий гомеобоксный белок *TGIF2*, репрессор транскрипции). В работе Song и соавторов (Song *et al.*, 2019) показано, что у крыс фиброз печени, индуцируемый употреблением 10% раствором фруктозы, связан с активацией передачи сигналов *TGFβ1/Smad* и *miR-34a/Sirt1/p53*.

Сигнальный путь *TNFα/NF-κB*

Многие сигнальные пути, активирующиеся при воспалении, направлены на регуляцию транскрипционного фактора *NF-κB*. Цитокины, принадлежащие к семейству *TNF*, индуцируют транскрипцию генов, регулирующих воспаление, выживаемость, пролиферацию и дифференцировку клеток, главным образом посредством активации пути *NF-κB*. Семейство *NF-κB* состоит из пяти родственных белков, *p50 (NF-κB1)* и *p52 (NF-κB2)*, *p65 (RelA)*, *RelB* и *c-Rel (Rel)*, которые имеют общий N-концевой участок длиной примерно 300 аминокислот названный доменом гомологии *Rel (RHD)*. *RHD* вступает в непосредственный контакт с ДНК, в то время как отдельные белковые домены опосредуют как положительные, так и отрицательные эффекты на транскрипцию генов-мишеней посредством рекрутирования коактиваторов и корепрессоров (Hayden, Ghosh, 2014). Белки *NF-κB p65*, *c-Rel* и *RelB* обладают трансактивационным доменом, позволяющим им инициировать транскрипцию посредством рекрутирования коактиватора. Белки *p50* и *p52* не имеют доменов трансактивации и могут влиять на транскрипцию либо путем гетеродимеризации с *p65*, *c-Rel* или *RelB*, либо посредством взаимодействия с факторами транскрипции, отличными от *Rel*, например, с негативными регуляторами передачи сигналов *NF-κB – IκB*. *IκB* образуют комплексы с димерами *NF-κB* и удерживают их в цитоплазме. Так называемый «классический» путь передачи сигнала *TNF* характеризуется индуцируемой деградацией комплекса *NF-κB-IκBα* в результате связывания *TNF* с *TNFR1*. После связывания лиганда с рецептором сигнал передается на *IKK-комплекс*, который фосфорилирует *IκB*. «Неканонический» путь представляет собой образование активных гетеродимеров *p52:RelB* посредством ограниченного протеолиза незрелого предшественника *NFKB2, p100*, связанным с *RelB*.

Некодирующие РНК регулируют различные компоненты *TNFα/NF-κB* сигнального пути при НАЖБП. Так, сверхэкспрессия микроРНК-125b способствует усилению процессов фосфорилирования *IκBα* и *p65* и секреции воспалительных факторов (Zhang *et al.*, 2021). МикроРНК-125b способствует *NF-κB*-опосредованному воспалительному

ответу при НАЖБП путем прямого нацеливания на ген *TNFAIP3*, кодирующий фактор некроза опухоли, альфа-индуцированный белок 3 или A20. Длинная некодирующая РНК HOTAIR положительно регулирует фосфорилирование p65 и активацию NF- κ B, результатом чего является усиление экспрессии генов провоспалительных белков, в том числе *IL6*, *TNF* (Wu *et al.*, 2023). MALAT1 модулирует активацию звездчатых клеток печени посредством регуляции оси микроРНК-181a/TLR4/NF- κ B, тем самым способствуя развитию фиброза печени (Wang *et al.*, 2021b). ДнРНК-gm9795 способствует воспалительной реакции при НАСГ, активируя экспрессию генов, кодирующих маркерные белки стресса эндоплазматического ретикулума *IRE1 α* , *BIP* и экспрессию генов провоспалительных цитокинов через пути NF- κ B и JNK (Ye *et al.*, 2021a). Gm9795 представляет собой псевдоген STAR-родственного домена переноса липидов (START).

Выявлена роль микроРНК-378 в формировании НАСГ и фиброза печени путем активации передачи сигналов TNF α (Zhang *et al.*, 2019c). На примере мышей с индуцированным высокожировой диетой стеатогепатитом показано, что микроРНК-378 непосредственно нацеливается на мРНК гена *Prkag2*, который кодирует AMP-активированную протеинкиназу γ 2 (AMPK γ 2). Передача сигналов AMPK негативно регулирует ось NF- κ B-TNF α за счет увеличения деацетилазной активности сиртуина 1. Нокаут микроРНК-378 приводит к усилению деацетилазной активности сиртуина и снижению активности оси NF- κ B-TNF α . Активация NF- κ B может способствовать подавлению микроРНК-29 при фиброзе печени (Ladeiro *et al.*, 2008). Установлена роль этой некодирующей РНК не только в формировании фиброза, но и НАЖБП (Lin *et al.*, 2019). Повышение содержания микроРНК-29а в печени уменьшает выраженность признаков стеатоза у мышей, находящихся на высокожировой диете (Lin *et al.*, 2019). Кроме этого, усиление экспрессии микроРНК-29а способствует снижению экспрессии в ткани печени эпителиального мезенхимального транскрипционного фактора *Snail*, содержания виментина и провоспалительных маркеров IL-6 и MCP1 (Lin *et al.*, 2019).

Хорошо изучена регуляция сигнального пути NF- κ B при гепатоцеллюлярной карциноме (ГЦК) (Jin *et al.*, 2017). Выявлена прямая реципрокная регуляция микроРНК компонентами сигнального пути NF- κ B. Так, микроРНК-26b подавляет NF- κ B сигналинг и повышает хемотаксис клеток ГЦК путем ингибирования TAK1 и TAK1-связывающего белка 3 (TAB3), двух положительных регуляторов, опосредующих активацию канонического пути NF- κ B (Zhao *et al.*, 2014). Были идентифицированы целые семейства или кластеры микроРНК, которые регулируют почти все

этапы пути NF- κ B. Среди них – микроРНК-195, член семейства микроРНК-15, играет решающую роль в регуляции пути TNF α /NF- κ B путем подавления I κ B- α и TAB3 при ГЦК (Ding *et al.*, 2013). p65/NF- κ B является прямым регулятором транскрипции микроРНК-224 (Scisciani *et al.*, 2012). Экспрессия микроРНК-224 не обнаруживается в печени здоровых людей, однако по мере прогрессирования НАЖБП уровень микроРНК-224 увеличивается (Gong *et al.*, 2015). У пациентов с фиброзом печени (стадии F3-F4) уровень этой микроРНК в клетках печени почти в 1.7 раза выше, чем у больных НАЖБП без признаков фиброза (Leti *et al.*, 2015).

TNF α играет одну из ключевых ролей в развитии НАСГ. Было продемонстрировано, что у пациентов с НАСГ со значительным фиброзом наблюдается повышенная экспрессия мРНК *TNF* по сравнению с пациентами с минимальным или отсутствующим фиброзом (Crespo, 2001). Усиление опосредованного TNF α /TNFR сигнального пути посредством активации клеток Купфера аутокринным или паракринным образом может иметь решающее значение в патогенезе фиброза печени при НАСГ (Tomita, 2006). TNF α , IFN- γ , TGF β являются индукторами продукции микроРНК-155 (O'Connell *et al.*, 2007). Общее количество предсказанных потенциальных мишеней микроРНК-155 (согласно базе данных miRBaseSequence) составляет 991, хотя было изучено лишь ограниченное число мРНК этих генов. Экспериментально подтверждены такие как *C/EBP β* и *SOC1* (Faraoni *et al.*, 2009; He *et al.*, 2009). Экспрессия микроРНК-155 может индуцироваться при активации макрофагов, дендритных клеток, В-клеток и Т-клеток посредством NF- κ B и белка-активатора (AP)-1 (Gottwein, 2013). Показано, что при гепатоцеллюлярной карциноме, индуцированной стеатогепатитом, наблюдается активация микроРНК-155, сопровождающаяся снижением экспрессии *C/EBP β* и активацией NF- κ B (Wang *et al.*, 2009). Дефицит микроРНК-155 у нокаутных мышей ослаблял стеатоз и фиброз печени, вызванные диетой с дефицитом метионина-холина, без уменьшения воспаления (Csak *et al.*, 2015).

Недавно была обнаружена новая межгенная днРНК, обозначенная как днФНО (IncTNF), уровень которой после стимуляции клеток HepG2 обработкой раствором TNF α повышался более чем в 20 раз (Atanasovska *et al.*, 2021). Экспрессия этой днРНК положительно коррелировала с лобулярным воспалением в печени человека. Нокаут IncTNF в клетках HepG2 снижал активность транскрипционного фактора NF- κ B и подавлял экспрессию генов-мишеней *A20* и *NFKB1A*. IncTNF может представлять собой новую мишень для контроля воспаления печени.

IL-6/JAK/STAT3 сигнальный путь

Среди сигнальных путей, которые опосредуют развитие НАСГ и фиброза печени, IL-6/JAK/STAT3 играет ключевую роль, как в процессе регенерации печени, так и повреждении гепатоцитов. Следует отметить, что в настоящее время не совсем понятно, оказывает ли повышенный уровень IL-6 позитивный или негативный эффект в отношении функций печени при НАЖБП. Уровень IL-6 в клетках печени и в плазме крови при данном заболевании значительно повышен (Wieckowska *et al.*, 2008; Hou *et al.*, 2021). Обнаружена положительная корреляция его содержания со значениями биохимических показателей, отражающих функциональное состояние этого органа, с уровнем провоспалительных маркеров, признаками портальной гипертензии и степенью фиброза печени (Streetz *et al.*, 2003), с количеством лейкоцитов и моноцитов (Hou *et al.*, 2021). Как оказалось, у больных НАЖБП с фиброзом (S1, S2–S3) уровень IL-6 выше, чем у пациентов без фиброза (S0) (Hou *et al.*, 2021). У пациентов с НАЖБП наблюдается изменение уровня растворимого рецептора IL-6R (Hou *et al.*, 2021; Курбатова и др., 2023). Причем, оказалось, что при высокой активности НАСГ концентрация растворимого IL-6R в крови пациентов резко снижена по сравнению с более ранними стадиями прогрессирования НАЖБП (Курбатова и др., 2023). Повышенный уровень IL-6 в плазме у пациентов с НАЖБП, вероятно, обусловлен усилением его секреции разными типами клеток, включая фибробласты, моноциты, макрофаги, нейтрофилы и гепатоциты, поскольку все они продуцируют IL-6 (Schmidt-Arras, Rose-John, 2016). Получены свидетельства его патологической роли в прогрессировании НАЖБП (Курбатова, Дуданова, 2017). Показана роль интерлейкина-6 в формировании фиброза печени. Во время повреждения печени ЗКП могут подвергаться активации и трансформироваться в клетки, экспрессирующие альфа-гладкомышечный актин (α SMA), сократительные миофибробластоподобные клетки. Показано, что первичные ЗКП мышечной, обработанные раствором рекомбинантного IL-6, характеризовались повышенной регуляцией уровня мРНК α SMA и *Colla*, а также повышением содержания белка α SMA и активацией JAK/STAT3 сигнального пути (Kagan *et al.*, 2017).

Специфическая активность IL-6 связана со способностью активировать гены-мишени, участвующие в процессах дифференцировки, выживаемости, апоптоза и пролиферации клеток (Naka *et al.*, 2002). Интерлейкин 6 участвует в модулировании баланса Th1 и Th2 клеток (Nishihara *et al.*, 2007). Он способствует дифференцировке клеток Th2 путем усиления продукции ИЛ-4 CD4+Т-клетками (Rincón, Flavell, 1997). Интерлейкин 6 способствует продукции другого цитокина, также

вырабатываемого Th2 клетками, – IL-13 (Neveu *et al.*, 2009). IL-6 препятствует выработке CD4 Т-клетками интерферона гамма, посредством сверхрегуляции супрессоров цитокинового сигналинга (SOC1и SOC3). SOC факторы обеспечивают отрицательную обратную связь и снижают активность IFN γ сигналинга (Diehl *et al.*, 2000). Интерлейкин 6 в комбинации с TGF β участвует в дифференцировке Т-регуляторных клеток (Treg) в Т-хелперы 17 (Th17) (Bettelli *et al.*, 2006). Через индукцию IL-17, интерлейкин 6 способствует рекрутированию нейтрофилов и макрофагов и их миграции в очаг воспаления. Также этот цитокин стимулирует продукцию наивными CD4 Т-клетками и клетками памяти IL-21 (Dienz *et al.*, 2009). IL-21 участвует в дифференцировке В клеток, продуцирующих иммуноглобулины (Dienz *et al.*, 2009).

Важно, что интерлейкин 6 обильно вырабатывается как клетками врожденного, так и приобретенного иммунитета, являясь таким образом «стратегическим» мостом между врожденным и приобретенным иммунитетом. Этот цитокин способствует дифференцировке моноцитов в макрофаги и дендритные клетки (Chomarat *et al.*, 2000), участвует в регуляции экспрессии различных хемокинов и хемокиновых рецепторов, например, CCR7, CXCL1, CXCL5 (Scheller *et al.*, 2011). Плейотропность действия IL-6 на клетки обусловлена сложностью механизмов сигналинга, посредством которых данный цитокин реализует свое действие на клетки. Выделяют классический IL-6-сигналинг и транс-сигналинг. Альтернативный классическому, тип сигналинга (через комплекс IL-6/sIL-6R) был назван IL-6-транс-сигналингом. Образование растворимой формы IL-6R расширяет спектр клеток-мишеней интерлейкина-6. В клетках-мишенях IL-6 в первую очередь связывается с мембраносвязанным α -рецептором IL-6R (mbIL-6R). Этот комплекс затем связывается с двумя молекулами GP130, что приводит к передаче сигнала, которая включает активацию JAK/STAT, ERK и PI3K сигнальных путей. Помимо этого, IL-6 способен связываться с растворимыми sIL-6R (Mitsuyama *et al.*, 2006). Растворимые рецепторы IL-6 выступают в качестве усилителей эффекта этого цитокина и опосредуют активацию транс-сигнального пути в клетках, на поверхности которых отсутствует mbIL-6R (Scheller *et al.*, 2011). Увеличение уровня sIL-6R, наблюдаемое при воспалении, в основном связано с активацией процессов протеолитического расщепления mbIL-6R (эктодоменный шеддинг) металлопротеазами семейства ADAM (Scheller *et al.*, 2011). Активация GP130 транс-сигнальным путем имеет решающее значение для перемещения лимфоцитов в места воспаления. Комплекс IL-6/sIL-6R вовлечен в контроль за проницаемостью сосудов. Воздействуя на фибробласты и индуцируя продукцию сосудистого эндотелиального фактора

роста (VEGF), IL-6/sIL-6R способен активировать клетки эндотелия (Nakahara *et al.*, 2003). Повышенная проницаемость эндотелия может усилить миграцию воспалительных клеток в пораженные ткани и, следовательно, способствовать их повреждению. Повышенный уровень IL-6 в местах воспаления также может способствовать инфильтрации фибробластов в очаг воспаления.

Что касается неалкогольной жировой болезни печени, то роль активации транс-сигнального пути в патогенезе этого заболевания пока еще не совсем понятна. IL-6/GP130 путь считается протекторным в отношении тяжести фиброза в непаренхимальных клетках печени (Streetz, 2003). По всей вероятности, его блокирование, например, посредством растворимого GP130, может способствовать усилению фиброза печени и ухудшению функционирования этого органа при НАЖБП (Lemmers *et al.*, 2009). Считается, что противовоспалительные эффекты IL-6 реализуются посредством классического сигнального пути, тогда как провоспалительное действие главным образом связано с транс-сигналингом. sIL-6R в основном продуцируется гепатоцитами и миелоидными клетками, которые ответственны примерно за 60% и 40% циркулирующего sIL-6R соответственно (McFarland-Mancini *et al.*, 2010). Передача сигналов IL-6 в миелоидных клетках (клетках, которые являются предшественниками гранулоцитов, макрофагов (зрелый моноцит), тучных клеток или миелоидных дендритных клеток) действует как антифиброзный сигнал.

Содержание IL-6 в основном регулируется на транскрипционном уровне транскрипционными факторами NF- κ B и C/EBP α . Их активность в свою очередь регулируется через запуск сигнальных путей при воспалении и, вероятно, может зависеть от соотношения мембраносвязанных и растворимых рецепторов цитокинов. Действительно, IL-6/sIL-6R комплекс активирует p65, NF- κ B и STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) транскрипционные факторы и способствует увеличению содержания мРНК генов *IL6*, *GP130*, *STAT3* (Kim *et al.*, 2011). МикроРНК-34а супрессирует транскрипционную активность гена *IL6R* (Li *et al.*, 2015; Yokomizo *et al.*, 2019). Как оказалось, IL-6 регулирует уровень рецепторов IL-6R и IL-6ST (Gp130, OncostatinMReceptor). Повышение содержания этого цитокина способствует изменению уровня микроРНК-181a-3р, -214-3р, -18a-5р, -938, которые, в свою очередь, ингибируют экспрессию гена *IL6R* (Candido *et al.*, 2021).

Показано, что при некоторых онкологических заболеваниях экспрессия гена *IL6R* положительно коррелирует с уровнем днРНК LINC01116. В регуляции уровня транскриптов *IL6R* и LINC01116 играет роль микроРНК-520a-3р, которая нацелена на 3'-НТО LINC01116 и *IL6R* (Zhang *et al.*, 2018). Экспрессию гена *IL6R* регулирует микроРНК-136.

Длинная некодирующая РНК CRNDE (Colorectal Neoplasia Differentially Expressed) может усиливать экспрессию гена *IL6R*, спонжируя микроРНК-136 (Zhang *et al.*, 2019d). В регуляции экспрессии *IL6R* участвует микроРНК-451a. Снижение уровня последней способствует активации сигнального пути JAK/STAT (Feng *et al.*, 2019). С использованием клеток HepG2, обработанных свободными жирными кислотами, показано, что микроРНК-451a может участвовать в стеатозе печени путем регуляции экспрессии гена *THRSP* (Thyroid Hormone-Inducible Hepatic Protein), который представляет собой новую потенциальную мишень для терапии НАЖБП (Zeng *et al.*, 2018). МикроРНК-211 связывается с 3'-НТО мРНК гена *IL6R*, регулируя уровень его транскриптов (Chen *et al.*, 2019). МикроРНК-211 является мишенью HOTAIR, которая участвует в регуляции состояния хроматина и вызывает молчание генов путем взаимодействия с гистонметилазой и гистондеметилазой (Bhan, Mandal, 2015). Сверхэкспрессия HOTAIR и нокдаун микроРНК-211 связаны с повышенной экспрессией IFN γ , IL-6, IL-17, TNF α , IL-1 β и IL-6R в моноцитах. В плазме пациентов с НАЖБП концентрации микроРНК-211 коррелировали с уровнями АСТ (Mehta *et al.*, 2016). Таким образом, ось HOTAIR/miR-211/IL6R может быть задействована в регуляции воспаления и выживаемости или гибели иммунных клеток и, возможно, гепатоцитов. МикроРНК-124 (отдельно или вместе с микроРНК-7) ингибирует активацию IL-6R и NF- κ B (Rel-A) (Bhan, Mandal, 2015). Следует отметить, что сведений относительно изменения уровня этих некодирующих РНК у пациентов с НАЖБП и фиброзом печени в настоящее время в имеющийся литературе мы не встретили.

Как уже отмечалось, IL-6 активирует транскрипционный фактор STAT3, который является ключевым регулятором фиброза печени (Zhao *et al.*, 2021). STAT3 играет положительную роль в регуляции выживания и пролиферации клеток. Однако его постоянная активация может приводить к запуску процессов, имеющих негативный эффект в отношении функций печени. Так, постоянная активация STAT3 играет решающую роль в фиброгенезе печени. Активация STAT3 обнаружена во многих фиброзных тканях (Kasembeli *et al.*, 2018). Показана роль активации STAT3 в накоплении липидов и развитии стеатоза (Belloni *et al.*, 2018). Так, ингибирование STAT3 уменьшало накопление липидов, вызванное обработкой клеток dHepaRG раствором олеата натрия. Более того, ингибирование STAT3 в этих клетках с помощью S3I-201 (химический ингибитор STAT3) способствовало нормализации уровня экспрессии генов, регулирующих метаболизм липидов. Однако молекулярные механизмы, посредством которых STAT3 участвует в инициации и прогрессировании стеатоза и фиброза печени, до сих пор полностью не изучены.

Антивоспалительный и провоспалительные эффекты активации STAT3 при заболеваниях печени также могут регулироваться эпигенетически. Довольно полно изучена роль регуляции IL-6/STAT3 пути молекулами микроРНК и днРНК при гепатоцеллюлярной карциноме (Jin *et al.*, 2017). Известно, что IL-6/STAT3 путь активирует днРНК THOR (Ge *et al.*, 2020). ДнРНК TSLNC8 ингибирует фосфорилирование STAT3 (Zhang *et al.*, 2018). У больных ГЦК снижение экспрессии этой днРНК связано с плохим прогнозом выживаемости (Zhang *et al.*, 2018). Показано, что IL-6 активирует микроРНК-21 посредством прямого связывания STAT3 с вышестоящим энхансером (Kohanbash, Okada, 2012). У мышей, дефицитных по микроРНК-21 (miR21KO) наблюдается активация MAPK и STAT3 сигнальных путей и усиление экспрессии протоонкогенных генов (Correia De Sousa *et al.*, 2021). В то же время, микроРНК-21 является частью регуляторной сети, которая модулирует фиброгенез печени. Активация p65, STAT3 при обработке гепатоцитов раствором IL-6 или TNF α приводила к усилению экспрессии микроРНК-21 (Qian *et al.*, 2015). Qian и соавторы показали важную роль регуляторной сети, состоящей из HNF1 α (Hepatocyte nuclear factor 1 α), SHP-1, STAT3, p65, микроРНК-21 и микроРНК-146a, в развитии гепатоцеллюлярной недостаточности. Поврежденные гепатоциты высвобождают IL-6 и TGF β 1 для активации покоящихся ЗКП, а активированные ЗКП высвобождают IL-6 и TNF α , усиливая экспрессию микроРНК-21 и микроРНК-146a, что еще больше усугубляет повреждение печени (Qian *et al.*, 2015). Воздействие провоспалительных факторов на гепатоциты стимулирует экспрессию члена кластера микроРНК-17-92 – микроРНК-18a (Brock *et al.*, 2011). МикроРНК-18a нацелена на мРНК PIAS3 (E3 SUMO-протеинлигаза – транскрипционный модулятор), что приводит к усилению активности STAT3 и в итоге к высвобождению белков острой фазы (Brock *et al.*, 2011). Это представляет новую петлю положительной обратной связи передачи сигналов IL-6/STAT3 посредством участия микроРНК.

С использованием модельной системы транскрипционных рыбок данио со стабильной экспрессией микроРНК-21, показано, что эта микроРНК участвует в активации воспаления печени (или НАСГ) за счет увеличения экспрессии генов провоспалительных белков через сигнальный путь STAT3. Помимо этого, установлено, что микроРНК-21 через сигнальные пути TGF β /Smad3/Smad7 вызывает активацию звездчатых клеток (HSC), отложение коллагена и фиброз печени (Lai *et al.*, 2021).

Показана роль микроРНК-21 в формировании стеатоза печени и ее связь с активностью STAT3. Так, обработка клеток НераRG раствором олеата

натрия индуцировала развитие в них признаков, характерных при везикулярном стеатозе печени, активировала воспалительный ответ посредством регулирования фосфорилирования STAT3 по остатку тирозина в положении 705 аминокислотной последовательности (Belloni *et al.*, 2018). Авторами исследования в обработанных раствором олеата клетках были идентифицированы несколько микроРНК с повышенным уровнем экспрессии, в частности, микроРНК-21, микроРНК-181-b, микроРНК-18a и микроРНК-34. Количество микроРНК-26a, let7a, микроРНК-122 и miP-221, напротив, было снижено. Оказалось, что, фосфорилированная форма STAT3-Tyr705 после обработки клеток dHeraRG олеатом натрия может связываться с промоторами генов, включая регуляторную область гена, кодирующего микроРНК-21, таким образом, усиливая их транскрипционную активность. Ингибирование STAT3, напротив, снижает уровень экспрессии микроРНК-21 и способствует ослаблению признаков везикулярного стеатоза (Belloni *et al.*, 2018). STAT3 также регулирует уровень микроРНК-18a (Cao *et al.*, 2013).

С пироптозом гепатоцитов и развитием фиброза положительно связана экспрессия гена *ANXA2* (ген, кодирующий Аннексин A2) (Feng *et al.*, 2022). Фосфорилированная форма STAT3 (p-STAT3) связывается с промотором *ANXA2* и способствует его транскрипции. Ингибирование p-STAT3 может значительно подавлять пироптоз гепатоцитов и фиброз (Feng *et al.*, 2022). В работе Ye и соавторы (Ye *et al.*, 2021b) показано, что при фиброзе печени уровень экспрессии гена *STAT3* снижен. Согласно результатам биоинформатического анализа, выполненного в этом исследовании, мРНК гена *STAT3* является мишенью для микроРНК-200a-3p и ее повышенная экспрессия может способствовать снижению уровня мРНК гена *STAT3* и, вероятно, активности IL-6/JAK/STAT3 сигнального пути (Ye *et al.*, 2021b).

Уровень экспрессии *STAT3* регулируется Крупноподобным фактором 6 (KLF6). мРНК гена *KLF6* является мишенью для микроРНК-148. Оказалось, что микроРНК-148, содержащаяся в экзосомах мезенхимальных стволовых клеток, за счет модулирования JAK/STAT3 пути способна снижать соотношение про- и противовоспалительных макрофагов печени, и, таким образом, способствовать снижению фибротических процессов в этом органе (Tian *et al.*, 2022).

Таким образом, учитывая роль некодирующих РНК в патогенезе НАЖБП и формировании фиброза печени, можно заключить, что они могут быть потенциальными малоинвазивными маркерами прогрессирования НАЖБП и стадий фиброза. Однако в настоящее время недостаточно данных литературы относительно соответствия уровня некодирующих РНК определенным формам этого

заболевания, тяжести течения НАСГ и степени фиброза, чтобы обозначить их как высокоспецифические, имеющие диагностическое значение молекулярно-генетические маркеры.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № FMEN-2022-0009 (№ гос. регистрации 122031100064-4).

БИОЭТИКА

Авторы подтверждают, что данная статья не является оригинальным исследованием, а представляет собой обзор данных литературы. Одобрение этического комитета не требуется.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Курбатова И.В., Дуданова О.П. Особенности некротически-воспалительного процесса при разных формах неалкогольной жировой болезни печени. Терапевтический архив. 2017. Вып. 89, № 2. С. 52–58. DOI: 10.17116/terarkh201789252-58
- Курбатова И.В., Топчиева Л.В., Дуданова О.П., Шиповская А.А. Роль растворимого рецептора интерлейкина-6 в прогрессировании неалкогольной жировой болезни печени. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2023. Вып. 174, № 5. С. 628–633. DOI: 10.47056/0365-9615-2022-174-11-585-591
- Лазебник Л.Б., Голованова Е.В., Туркина С.В., Райхельсон К.Л., Оковитый С.В., Драпкина О.М., Маев И.В., Мартынов А.И., Ройтберг Г.Е., Хлынова О.В., Абдулганиева Д.И., Алексеенко С.А., Ардатская М.Д., Бакулин И.Г., Бакулина Н.В., Буеверов А.О., Виницкая Е.В., Волинец Г.В., Еремина Е.Ю., Гриневич В.Б., Долгушина А.И., Казюлин А.Н., Кашкина Е.И., Козлова И.В., Конев Ю.В., Корочанская Н.В., Кравчук Ю.А., Ли Е.Д., Лоранская И.Д., Махов В.М., Мехтиев С.Н., Новикова В.П., Остроумова О.Д., Павлов Ч.С., Радченко В.Г., Самсонов А.А., Сарсенбаева А.С., Сайфутдинов Р.Г., Селиверстов П.В., Ситкин С.И., Стефанюк О.В., Тарасова Л.В., Ткаченко Е.И., Успенский Ю.П., Фоминых Ю.А., Хавкин А.И., Цыганова Ю.В., Шархун О.О. Неалкогольная жировая болезнь печени у взрослых: клиника, диагностика, лечение. Рекомендации для терапевтов, третья версия. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2021. Вып. 185, № 1. С. 4–52. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-185-1-4-52
- Маевская М.В., Котовская Ю.В., Ивашкин В.Т., Ткачева О.Н., Трошина Е.А., Шестакова М.В., Бредер В.В., Гейвандова Н.И., Доцицин В.Л., Дудинская Е.Н., Ершова Е.В., Кодзоева Х.Б., Комшилова К.А., Корочанская Н.В., Майоров А.Ю., Мишина Е.Е., Надинская М.Ю., Никитин И.Г., Погосова Н.В., Тарзиманова А.И., Шамхалова М.Ш. Консенсус для врачей по ведению взрослых пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени и ее основными коморбидными состояниями. Терапевтический архив. 2022. Вып. 94, № 2. С. 216–253. DOI: 10.26442/00403660.2022.02.201363
- Циммерман Я.С. Фиброз печени: патогенез, методы диагностики, перспективы лечения. Клиническая фармакология и терапия. 2017. Вып. 1. 26, № 1. С. 54–58.
- Albadawy R., Agwa S.H.A., Khairy E., Saad M., El Touchy N., Othman M., El Kassas M., Matboli M. Circulatory Endothelin 1-Regulating RNAs Panel: Promising Biomarkers for Non-Invasive NAFLD/NASH Diagnosis and Stratification: Clinical and Molecular Pilot Study // Genes. 2021a. Vol. 12, № 11. P. 1813. DOI: 10.3390/genes12111813.
- Albadawy R., Agwa S.H. A., Khairy E., Saad M., El Touchy N., Othman M., Matboli M. Clinical Significance of HSPD1/MMP14/ITGB1/miR-6881-5P/Lnc-SPARCL1-1:2 RNA Panel in NAFLD/NASH Diagnosis: Egyptian Pilot Study // Biomedicines. 2021b. Vol. 9, № 9. P. 1248. DOI: 10.3390/biomedicines9091248.
- Atanasovska B., Rensen S.S., Marsman G., Shiri-Sverdlov R., Withoff S., Kuipers F., Wijmenga C., Van De Sluis B., Fu J. Long Non-Coding RNAs Involved in Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease to Steatohepatitis // Cells. 2021. Vol. 10, № 8. P. 1883. DOI: 10.3390/cells10081883.
- Baffy G. MicroRNAs in Nonalcoholic Fatty Liver Disease // J. Clin. Med. 2015. Vol. 4, № 12. P. 1977–1988. DOI: 10.3390/jcm4121953
- Bartel D.P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions // Cell. 2009. Vol. 136, № 2. P. 215–233. DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.002
- Belloni L., Di Cocco S., Guerrieri F., Nunn A.D. G., Picconese S., Salerno D., Testoni B., Pulito C., Mori F., Pallocca M., Sacconi A., Vivoli E., Marra F., Strano S., Blandino G., Levrero M., Pediconi N. Targeting a phospho-STAT3-miRNAs pathway improves vesicular hepatic steatosis in an in vitro and in vivo model // Sci. Rep. 2018. Vol. 8, № 1. P. 13638. DOI: 10.1038/s41598-018-31835-2
- Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T.B., Oukka M., Weiner H.L., Kuchroo V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic

- effector TH17 and regulatory T cells // *Nature*. 2006. Vol. 441, № 7090. P. 235–238.
DOI: 10.1038/nature04753
- Bhan A., Mandal S.S. LncRNA HOTAIR: A master regulator of chromatin dynamics and cancer // *Biochim. Biophys. Acta BBA – Rev. Cancer*. 2015. Vol. 1856, № 1. P. 151–164.
DOI: 10.1016/j.bbcan.2015.07.001
- Brock M., Trenkmann M., Gay R.E., Gay S., Speich R., Huber L.C. MicroRNA-18a Enhances the Interleukin-6-mediated Production of the Acute-phase Proteins Fibrinogen and Haptoglobin in Human Hepatocytes // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286, № 46. P. 40142–40150.
DOI: 10.1074/jbc.M111.251793
- Bu, F., Wang, A., Zhu, Y., You, H., Zhang, Y., Meng, X., Huang, C., Li, J. LncRNA NEAT1: Shedding light on mechanisms and opportunities in liver diseases // *Liver Int.* 2020. Vol. 40, № 11. P. 2612–2626.
DOI: 10.1111/liv.14629
- Candido S., Tomasello B.M. R., Lavoro A., Falzone L., Gattuso G., Libra M. Novel Insights into Epigenetic Regulation of IL6 Pathway: In Silico Perspective on Inflammation and Cancer Relationship // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 18. P. 10172.
DOI: 10.3390/ijms221810172
- Cao Q., Li Y.-Y., He W.-F., Zhang Z.-Z., Zhou Q., Liu X., Shen Y., Huang, T.-T. Interplay between microRNAs and the STAT3 signaling pathway in human cancers // *Physiol. Genomics*. 2013. Vol. 45, № 24. P. 1206–1214.
DOI: 10.1152/physiolgenomics.00122.2013
- Cermelli S., Ruggieri A., Marrero J.A., Ioannou G.N., Beretta L. Circulating MicroRNAs in Patients with Chronic Hepatitis C and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease // *PLoS ONE* / ed. Tavis J.E. 2011. Vol. 6, № 8. P. e23937.
DOI: 10.1371/journal.pone.0023937
- Chen J., Gu X., Zhou L., Wang S., Zhu L., Huang Y., Cao F. Long non coding RNA HOTAIR promotes the progression of sepsis by acting as a sponge of miR211 to induce IL 6R expression // *Exp. Ther. Med.* 2019.
DOI: 10.3892/etm.2019.8063
- Chen S., Zhang J., Chen Q., Cheng J., Chen X., Mao Y., Chen W., Liu C., Wu H., Lv Y., & Lin Y. MicroRNA 200a and microRNA 141 have a synergetic effect on the suppression of epithelial mesenchymal transition in liver cancer by targeting STAT4 // *Oncol. Lett.* 2020. Vol. 21, № 2. P. 137.
DOI: 10.3892/ol.2020.12398
- Chomarat P., Banchereau J., Davoust J., Karolina Palucka A. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages // *Nat. Immunol.* 2000. Vol. 1, № 6. P. 510–514.
DOI: 10.1038/82763
- Chu Y., Bao L., Teng Y., Yuan B., Ma L., Liu Y., Kang H. The Fibrotic Effects of LINC00663 in Human Hepatic Stellate LX-2 Cells and in Bile Duct-Ligated Cholestasis Mice Are Mediated through the Splicing Factor 2-Fibronectin // *Cells*. 2023. Vol. 12, № 2. P. 215.
DOI: 10.3390/cells12020215
- Correia De Sousa M., Calo N., Sobolewski C., Gjorgjieva M., Clément S., Maeder C., Dolicka D., Fournier M., Vinet L., Montet X., Dufour J.-F., Humar B., Negro F., Sempoux C., Foti M. Mir-21 Suppression Promotes Mouse Hepatocarcinogenesis // *Cancers*. 2021. Vol. 13, № 19. P. 4983.
DOI: 10.3390/cancers13194983
- Crespo J. Gene expression of tumor necrosis factor [alpha] and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients // *Hepatology*. 2001. Vol. 34, № 6. P. 1158–1163.
DOI: 10.1053/jhep.2001.29628
- Csak T., Bala S., Lippai D., Kodys K., Catalano D., Iracheta-Vellve A., Szabo G. MicroRNA-155 Deficiency Attenuates Liver Steatosis and Fibrosis without Reducing Inflammation in a Mouse Model of Steatohepatitis // *PLOS ONE* / ed. Aldabe R. 2015. Vol. 10, № 6. P. e0129251.
DOI: 10.1371/journal.pone.0129251
- Cui S., Liu Z., Tao B., Fan S., Pu Y., Meng X., Li D., Xia H., Xu L. miR-145 attenuates cardiac fibrosis through the AKT/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway by directly targeting SOX9 in fibroblasts // *J. Cell. Biochem.* 2021. Vol. 122, № 2. P. 209–221.
DOI: 10.1002/jcb.29843
- Di Mauro S., Salomone F., Scamporrino A., Filippello A., Morisco F., Guido M., Lembo V., Cossiga V., Pipitone R., Grimaudo S., Malaguarnera R., Purrello F., Piro S. Coffee Restores Expression of lncRNAs Involved in Steatosis and Fibrosis in a Mouse Model of NAFLD // *Nutrients*. 2021. Vol. 13, № 9. P. 2952.
DOI: 10.3390/nu13092952
- Diehl S., Anguita J., Hoffmeyer A., Zapton T., Ihle J.N., Fikrig E., Rincón M. Inhibition of Th1 Differentiation by IL-6 Is Mediated by SOCS1 // *Immunity*. 2000. Vol. 13, № 6. P. 805–815.
DOI: 10.1016/s1074-7613(00)00078-9
- Dienz O., Eaton S.M., Bond J.P., Neveu W., Moquin D., Noubade R., Briso E.M., Charland C., Leonard W.J., Ciliberto G., Teuscher C., Haynes L., Rincon M. The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells // *J. Exp. Med.* 2009. Vol. 206, № 1. P. 69–78.
DOI: 10.1084/jem.20081571
- Ding J., Huang S., Wang Y., Tian Q., Zha R., Shi H., Wang Q., Ge C., Chen T., Zhao Y., Liang L., Li J., He X. Genome-wide screening reveals that miR-195 targets the TNF- α /NF- κ B pathway by down-regulating I κ B kinase alpha and TAB3 in hepatocellular carcinoma // *Hepatology*. 2013. Vol. 58, № 2. P. 654–666.
DOI: 10.1002/hep.26378
- Dongiovanni P., Meroni M., Longo M., Fargion S., Fracanzani A.L. MiRNA signature in NAFLD: A turning point for a non-invasive diagnosis // *Int. J. Mol. Sci.* MDPI AG, 2018. Vol. 19, № 12.
DOI: 10.3390/ijms19123966
- El-Agroudy N. N., El-Naga R. N., El-Razeq R. A., El-Deimerdash E. Forskolin, a hedgehog signalling inhibitor, attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis

- in rats // *Br. J. Pharmacol.* 2016. Vol. 173, № 22. P. 3248–3260.
DOI: 10.1111/bph.13611
- Estep M., Armistead D., Hossain N., Elarainy H., Goodman Z., Baranova A., Chandhoke V., Younossi Z.M.* Differential expression of miRNAs in the visceral adipose tissue of patients with non-alcoholic fatty liver disease // *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2010. Vol. 32, № 3. P. 487–497.
DOI: 10.1111/j.1365-2036.2010.04366.x
- Faraoni I., Antonetti F.R., Cardone J., Bonmassar E.* miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA // *Biochim. Biophys. Acta BBA – Mol. Basis Dis.* 2009. Vol. 1792, № 6. P. 497–505.
DOI: 10.1016/j.bbadis.2009.02.013
- Feng L., Yang X., Liang S., Xu Q., Miller M.R., Duan J., Sun Z.* Silica nanoparticles trigger the vascular endothelial dysfunction and prethrombotic state via miR-451 directly regulating the IL6R signaling pathway // *Part. Fibre Toxicol.* 2019. Vol. 16, № 1. P. 16.
DOI: 10.1186/s12989-019-0300-x
- Feng Y., Li W., Wang Z., Zhang R., Li Y., Zang L., Wang P., Li Z., Dong Y.* The p-STAT3/ANXA2 axis promotes caspase-1-mediated hepatocyte pyroptosis in non-alcoholic steatohepatitis // *J. Transl. Med.* 2022. Vol. 20, № 1. P. 497.
DOI: 10.1186/s12967-022-03692-1
- Frandsen H.S., Vej-Nielsen J. M., Smith L.E., Sun L., Mikkelson K.L., Thulesen A.P., Hagensen C.E., Yang F., Rogowska-Wrzęsinska A.* Mapping Proteome and Lipidome Changes in Early-Onset Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Using Hepatic 3D Spheroids // *Cells.* 2022. Vol. 11, № 20. P. 3216.
DOI: 10.3390/cells11203216
- Fuchs C., Traussnigg S., Trauner M.* Nuclear Receptor Modulation for the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease // *Semin. Liver Dis.* 2016. Vol. 36, № 01. P. 069–086.
DOI: 10.1055/s-0036-1571296
- Ge J., Han T., Shan L., Na J., Li Y., Wang J.* Long non-coding RNA THOR promotes ovarian Cancer cells progression via IL-6/STAT3 pathway // *J. Ovarian Res.* 2020. Vol. 13, № 1. P. 72.
DOI: 10.1186/s13048-020-00672-1
- Gong J., He X.-X., Tian D.-A.* Emerging role of microRNA in hepatocellular carcinoma (Review) // *Oncol. Lett.* 2015. Vol. 9, № 3. P. 1027–1033.
DOI: 10.3892/ol.2014.2816
- Gottwein E.* Roles of MicroRNAs in the Life Cycles of Mammalian Viruses // *Intrinsic Immunity* / ed. Cullen B.R. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. Vol. 371. P. 201–227.
DOI: 10.1007/978-3-642-37765-5_8
- Gross B., Pawlak M., Lefebvre P., Staels B.* PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2017. Vol. 13, № 1. P. 36–49.
DOI: 10.1038/nrendo.2016.135
- Guo C.-J., Pan Q., Li D.-G., Sun H., Liu B.-W.* miR-15b and miR-16 are implicated in activation of the rat hepatic stellate cell: An essential role for apoptosis // *J. Hepatol.* 2009. Vol. 50, № 4. P. 766–778.
DOI: 10.1016/j.jhep.2008.11.025
- Guy C.D., Suzuki A., Zdanowicz M., Abdelmalek M.F., Burchette J., Unalp A., Diehl A.M.* Hedgehog pathway activation parallels histologic severity of injury and fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease // *Hepatology.* 2012. Vol. 55, № 6. P. 1711–1721.
DOI: 10.1002/hep.25559
- Han M.-H., Lee J.H., Kim G., Lee E., Lee Y.R., Jang S.Y., Lee H.W., Chun J.M., Han Y.S., Yoon J.S., Kang M.K., Lee W.K., Kweon Y.O., Tak W.Y., Park S.Y., Park J.G., Hur K.* Expression of the Long Noncoding RNA GAS5 Correlates with Liver Fibrosis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease // *Genes.* 2020. Vol. 11, № 5. P. 545.
DOI: 10.3390/genes11050545
- Hata A., Chen Y.-G.* TGF- β Signaling from Receptors to Smads // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2016. Vol. 8, № 9. P. a022061.
DOI: 10.1101/cshperspect.a022061
- Hayden M.S., Ghosh S.* Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines // *Semin. Immunol.* 2014. Vol. 26, № 3. P. 253–266.
DOI: 10.1016/j.smim.2014.05.004
- He M., Xu Z., Ding T., Kuang D.-M., Zheng L.* MicroRNA-155 Regulates Inflammatory Cytokine Production in Tumor-associated Macrophages via Targeting C/EBP β // *Cell. Mol. Immunol.* 2009. Vol. 6, № 5. P. 343–352.
DOI: 10.1038/cmi.2009.45
- He Z., Yang D., Fan X., Zhang M., Li Y., Gu X., Yang M.* The Roles and Mechanisms of lncRNAs in Liver Fibrosis // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21, № 4. P. 1482.
DOI: 10.3390/ijms21041482
- Hou X., Yin S., Ren R., Liu S., Yong L., Liu Y., Li Y., Zheng M.H., Kunos G., Gao B., Wang H.* Myeloid-Cell-Specific IL-6 Signaling Promotes MicroRNA-223-Enriched Exosome Production to Attenuate NAFLD-Associated Fibrosis // *Hepatology.* John Wiley and Sons Inc, 2021. Vol. 74, № 1. P. 116–132.
DOI: 10.1002/hep.31658
- Jiang Y., Peng J., Song J., He J., Jiang M., Wang J., Ma L., Wang Y., Lin M., Wu H., Zhang Z., Gao D., Zhao Y.* Loss of Hlnc prevents diet-induced hepatic steatosis through binding of IGF2BP2 // *Nat. Metab.* 2021. Vol. 3, № 11. P. 1569–1584.
DOI: 10.1038/s42255-021-00488-3
- Jin K., Li T., Sánchez-Duffhues G., Zhou F., Zhang L.* Involvement of inflammation and its related microRNAs in hepatocellular carcinoma // *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, № 13. P. 22145–22165.
DOI: 10.18632/oncotarget.13530
- Kagan P., Sultan M., Tachlytski I., Safran M., Ben-Ari Z.* Both MAPK and STAT3 signal transduction pathways are necessary for IL-6-dependent hepatic stellate cells activation // *PLOS ONE* / ed. Avila M.A. 2017. Vol. 12, № 5. P. e0176173.
DOI: 10.1371/journal.pone.0176173

- Kalluri R., Weinberg R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition // *J. Clin. Invest.* 2009. Vol. 119, № 6. P. 1420–1428.
DOI: 10.1172/JCI39104
- Kasembeli M., Bharadwaj U., Robinson P., Tweardy D. Contribution of STAT3 to Inflammatory and Fibrotic Diseases and Prospects for its Targeting for Treatment // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19, № 8. P. 2299.
DOI: 10.3390/ijms19082299
- Kim S.-Y., Kim A.-Y., Lee H.-W., Son Y.-H., Lee G.-Y., Lee J.-W., Lee Y.-S., Kim J.-B. miR-27a is a negative regulator of adipocyte differentiation via suppressing PPAR γ expression // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. Vol. 392, № 3. P. 323–328.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.01.012
- Kim S.-K., Park K.-Y., Yoon W.-C., Park S.-H., Park K.-K., Yoo D.-H., Choe J.-Y. Melittin enhances apoptosis through suppression of IL-6/sIL-6R complex-induced NF- κ B and STAT3 activation and Bcl-2 expression for human fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis // *Joint Bone Spine.* 2011. Vol. 78, № 5. P. 471–477.
DOI: 10.1016/j.jbspin.2011.01.004
- Kohanbash G., Okada H. MicroRNAs and STAT interplay // *Semin. Cancer Biol.* 2012. Vol. 22, № 1. P. 70–75.
DOI: 10.1016/j.semcancer.2011.12.010
- Kwon H., Song K., Han C., Chen W., Wang Y., Dash S., Lim K., Wu T. Inhibition of hedgehog signaling ameliorates hepatic inflammation in mice with nonalcoholic fatty liver disease // *Hepatology.* 2016. Vol. 63, № 4. P. 1155–1169.
DOI: 10.1002/hep.28289
- Ladeiro Y., Couchy G., Balabaud C., Bioulac-Sage P., Pellerin L., Rebouissou S., Zucman-Rossi J. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations // *Hepatology.* 2008. Vol. 47, № 6. P. 1955–1963.
DOI: 10.1002/hep.22256
- Lai C.-Y., Yeh K.-Y., Lin C.-Y., Hsieh Y.-W., Lai H.-H., Chen J.-R., Hsu C.-C., Her G. MicroRNA-21 Plays Multiple Oncometabolic Roles in the Process of NAFLD-Related Hepatocellular Carcinoma via PI3K/AKT, TGF- β , and STAT3 Signaling // *Cancers.* 2021. Vol. 13, № 5. P. 940.
DOI: 10.3390/cancers13050940
- Lakner A.M., Steuerwald N.M., Walling T.L., Ghosh S., Li T., McKillop I. H., Russo M.W., Bonkovsky H.L., Schrum L.W. Inhibitory effects of microRNA 19b in hepatic stellate cell-mediated fibrogenesis // *Hepatology.* 2012. Vol. 56, № 1. P. 300–310.
DOI: 10.1002/hep.25613
- Lan X., Wu L., Wu N., Chen Q., Li Y., Du X., Wei C., Feng L., Li Y., Osoro E.K., Sun M., Ning Q., Yan X., Yang X., Li D., Lu S. Long Noncoding RNA lnc-HC Regulates PPAR γ -Mediated Hepatic Lipid Metabolism through miR-130b-3p // *Mol. Ther. – Nucleic Acids.* 2019. Vol. 18. P. 954–965.
DOI: 10.1016/j.omtn.2019.10.018
- Lee S.M., Muratalla J., Sierra-Cruz M., Cordoba-Chacon J. Role of hepatic peroxisome proliferator-activated receptor γ in non-alcoholic fatty liver disease // *J. Endocrinol.* 2023. Vol. 257, № 1. P. e220155.
DOI: 10.1530/JOE-22-0155
- Lemmers A., Gustot T., Durnez A., Evrard S., Moreno C., Quertinmont E., Vercruysse V., Demetter P., Franchimont D., Le Moine O., Geerts A., Devière J. An inhibitor of interleukin-6 trans-signalling, sgp130, contributes to impaired acute phase response in human chronic liver disease // *Clin. Exp. Immunol.* 2009. Vol. 156, № 3. P. 518–527.
DOI: 10.1111/j.1365-2249.2009.03916.x
- Leti F., Legendre C., Still C.D., Chu X., Petrick A., Gerhard G.S., DiStefano J. K. Altered expression of MALAT1 lncRNA in nonalcoholic steatohepatitis fibrosis regulates CXCL5 in hepatic stellate cells // *Transl. Res.* 2017. Vol. 190. P. 25–39.e21.
DOI: 10.1016/j.trsl.2017.09.001
- Leti F., Malenica I., Doshi M., Courtright A., Van Keuren-Jensen K., Legendre C., Still C.D., Gerhard G.S., DiStefano J. K. High-throughput sequencing reveals altered expression of hepatic microRNAs in nonalcoholic fatty liver disease-related fibrosis // *Transl. Res.* 2015. Vol. 166, № 3. P. 304–314.
DOI: 10.1016/j.trsl.2015.04.014
- Li X., Chen Y., Wu S., He J., Lou L., Ye W., Wang J. MicroRNA-34a and microRNA-34c promote the activation of human hepatic stellate cells by targeting peroxisome proliferator-activated receptor γ // *Mol. Med. Rep.* 2015. Vol. 11, № 2. P. 1017–1024.
DOI: 10.3892/mmr.2014.2846
- Li Z., Wang J., Zeng Q., Hu C., Zhang J., Wang H., Yan J., Li H., Yu Z. Long Noncoding RNA HOTTIP Promotes Mouse Hepatic Stellate Cell Activation via Downregulating miR-148a // *Cell. Physiol. Biochem.* 2018. Vol. 51, № 6. P. 2814–2828.
DOI: 10.1159/000496012
- Lin H.-Y., Wang F.-S., Yang Y.-L., Huang, Y.-H. MicroRNA-29a Suppresses CD36 to Ameliorate High Fat Diet-Induced Steatohepatitis and Liver Fibrosis in Mice // *Cells.* 2019. Vol. 8, № 10. P. 1298.
DOI: 10.3390/cells8101298
- Lin L.L., Wang W., Hu Z., Wang L.W., Chang J., Qian H. Negative feedback of miR-29 family TET1 involves in hepatocellular cancer // *Med. Oncol.* 2014. Vol. 31, № 12. P. 291.
DOI: 10.1007/s12032-014-0291-2
- Lino Cardenas C.L., Henaoui I.S., Courcot E., Roderburg C., Cauffiez C., Aubert S., Copin M.-C., Wallaert B., Glowacki F., Dewaeles E., Milosevic J., Maurizio J., Tedrow J., Marcet B., Lo-Guidice J.-M., Kaminski N., Barbry P., Luedde T., Perrais M., Pottier N. miR-199a-5p Is Upregulated during Fibrogenic Response to Tissue Injury and Mediates TGF β -Induced Lung Fibroblast Activation by Targeting Caveolin-1 // *PLoS Genet.* / ed. Scott H.S. 2013. Vol. 9, № 2. P. e1003291.
DOI: 10.1371/journal.pgen.1003291

- Liu J., Tang T., Wang G.-D., Liu B. LncRNA-H19 promotes hepatic lipogenesis by directly regulating miR-130a/PPAR γ axis in non-alcoholic fatty liver disease // *Biosci. Rep.* 2019. Vol. 39, № 7. DOI: 10.1042/BSR20181722
- McFarland-Mancini M.M., Funk H.M., Paluch A.M., Zhou M., Giridhar P.V., Mercer C.A., Kozma S.C., Drew A.F. Differences in Wound Healing in Mice with Deficiency of IL-6 versus IL-6 Receptor // *J. Immunol.* 2010. Vol. 184, № 12. P. 7219–7228. DOI: 10.4049/jimmunol.0901929
- Mehta R., Otgonsuren M., Younoszai Z., Allawi H., Raybuck B., Younossi Z. Circulating miRNA in patients with non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease // *BMJ Open Gastroenterol.* 2016. Vol. 3, № 1. DOI: 10.1136/bmjgast-2016-000096
- Mitsuyama K., Sata M., Rose-John S. Interleukin-6 trans-signaling in inflammatory bowel disease // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006. Vol. 17, № 6. P. 451–461. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2006.09.003
- Mittal S., Inamdar S., Acharya J., Pekhale K., Kalamkar S., Boppana R., Ghaskadbi S. miR-3666 inhibits development of hepatic steatosis by negatively regulating PPAR γ // *Biochim. Biophys. Acta BBA – Mol. Cell Biol. Lipids.* 2020. Vol. 1865, № 10. P. 158777. DOI: 10.1016/j.bbalip.2020.158777
- Mòdol T., Brice N., Ruiz De Galarreta M., García Garzón A., Iraburu M.J., Martínez-Irujo J. J., López-Zabalza M. J. Fibronectin Peptides as Potential Regulators of Hepatic Fibrosis Through Apoptosis of Hepatic Stellate Cells // *J. Cell. Physiol.* 2015. Vol. 230, № 3. P. 546–553. DOI: 10.1002/jcp.24714
- Morán-Salvador E., López-Parra M., García-Alonso V., Títos E., Martínez-Clement, M., González-Pérez A., López-Vicario C., Barak Y., Arroyo V., Clària, J. Role for PPAR γ in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts // *FASEB J.* 2011. Vol. 25, № 8. P. 2538–2550. DOI: 10.1096/fj.10-173716
- Morán-Salvador E., Títos E., Rius B., González-Pérez A., García-Alonso V., López-Vicario C., Miquel R., Barak Y., Arroyo V., Clària J. Cell-specific PPAR γ deficiency establishes anti-inflammatory and anti-fibrogenic properties for this nuclear receptor in non-parenchymal liver cells // *J. Hepatol.* 2013. Vol. 59, № 5. P. 1045–1053. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.06.023
- Naka T., Nishimoto N., Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. // *Arthritis Res.* 2002. Vol. 4, № Suppl 3. P. S233. DOI: 10.1186/ar565
- Nakahara H., Song J., Sugimoto M., Hagihara K., Kishimoto T., Yoshizaki K., Nishimoto N. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* 2003. Vol. 48, № 6. P. 1521–1529. DOI: 10.1002/art.11143
- Neveu W.A., Allard J.B., Dienz O., Wargo M.J., Ciliberto G., Whittaker L.A., Rincon M. IL-6 Is Required for Airway Mucus Production Induced by Inhaled Fungal Allergens // *J. Immunol.* 2009. Vol. 183, № 3. P. 1732–1738. DOI: 10.4049/jimmunol.0802923
- Nishihara M., Ogura H., Ueda N., Tsuruoka M., Kitabayashi C., Tsuji F., Aono H., Ishihara K., Huseby E., Betz U.A. K., Murakami M., Hirano T. IL-6–gp130–STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state // *Int. Immunol.* 2007. Vol. 19, № 6. P. 695–702. DOI: 10.1093/intimm/dxm045
- O’Connell R.M., Taganov K.D., Boldin M.P., Cheng G., Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007. Vol. 104, № 5. P. 1604–1609. DOI: 10.1073/pnas.0610731104
- Ogawa T., Enomoto M., Fujii H., Sekiya Y., Yoshizato K., Ikeda K., Kawada, N. MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis // *Gut.* 2012. Vol. 61, № 11. P. 1600–1609. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-300717
- Pan Y., Wang J., He L., Zhang F. MicroRNA-34a Promotes EMT and Liver Fibrosis in Primary Biliary Cholangitis by Regulating TGF- β 1/smad Pathway // *J. Immunol. Res.* / ed. Ciccacci C. 2021. Vol. 2021. P. 1–13. DOI: 10.1155/2021/6890423
- Pettinelli P., Videla L.A. Up-Regulation of PPAR- γ mRNA Expression in the Liver of Obese Patients: an Additional Reinforcing Lipogenic Mechanism to SREBP-1c Induction // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011. Vol. 96, № 5. P. 1424–1430. DOI: 10.1210/jc.2010-2129
- Powell E.E., Wong V.W.S., Rinella M. Non-alcoholic fatty liver disease // *The Lancet. Elsevier B.V.*, 2021. Vol. 397, № 10290. P. 2212–2224. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32511-3
- Puengel T., Liu H., Guillot A., Heymann F., Tacke F., Peiseler M. Nuclear Receptors Linking Metabolism, Inflammation, and Fibrosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, № 5. P. 2668. DOI: 10.3390/ijms23052668
- Qian H., Deng X., Huang Z.-W., Wei J., Ding C.-H., Feng R.-X., Zeng X., Chen Y.-X., Ding J., Qiu L., Hu Z.-L., Zhang X., Wang H.-Y., Zhang J.-P., Xie W.-F. An HN-F1 α -regulated feedback circuit modulates hepatic fibrogenesis via the crosstalk between hepatocytes and hepatic stellate cells // *Cell Res.* 2015. Vol. 25, № 8. P. 930–945. DOI: 10.1038/cr.2015.84

- Qin R., Huang W., Huang Y., Zhang Z., Su Y., Chen S., Wang H.* lncRNA MEG3 modulates hepatic stellate cell activation by sponging miR145 to regulate PPAR γ // *Mol. Med. Rep.* 2021. Vol. 25, № 1. P. 3. DOI: 10.3892/mmr.2021.12519
- Qin X., Wang W., Wu H., Liu D., Wang R., Xu J., Jiang H., Pan F.* PPAR γ -mediated microglial activation phenotype is involved in depressive-like behaviors and neuroinflammation in stressed C57BL/6J and ob/ob mice // *Psychoneuroendocrinology*. 2020. Vol. 117. P. 104674. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2020.104674
- Rincón M., Flavell R.A.* Transcriptional control in the Th1/Th2 decision // *Curr. Biol.* 1997. Vol. 7, № 11. P. R729–R732. DOI: 10.1016/s0960-9822(06)00368-x
- Rohilla S., Kaur S., Puria R.* Long non-coding RNA in Non-alcoholic fatty liver disease // *Adv. Clin. Chem. Academic Press Inc.*, 2022. Vol. 110. P. 1–35. DOI: 10.1016/bs.acc.2022.06.001
- Scheller J., Chalaris A., Schmidt-Arras D., Rose-John S.* The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 // *Biochim. Biophys. Acta BBA – Mol. Cell Res.* 2011. Vol. 1813, № 5. P. 878–888. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034
- Schmidt-Arras D., Rose-John S.* IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy // *J. Hepatol.* 2016. Vol. 64, № 6. P. 1403–1415. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.02.004
- Scisciani C., Vossio S., Guerrieri F., Schinzari V., De Iaco R., D'Onorio De Meo P., Cervello M., Montalto G., Pollicino T., Raimondo G., Levrero M., Pediconi N.* Transcriptional regulation of miR-224 upregulated in human HCCs by NF κ B inflammatory pathways // *J. Hepatol.* 2012. Vol. 56, № 4. P. 855–861. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.11.017
- Shen X., Guo H., Xu J., Wang, J.* Inhibition of lncRNA HULC improves hepatic fibrosis and hepatocyte apoptosis by inhibiting the MAPK signaling pathway in rats with nonalcoholic fatty liver disease // *J. Cell. Physiol.* 2019. Vol. 234, № 10. P. 18169–18179. DOI: 10.1002/jcp.28450
- Shu B., Zhou Y.-X., Li H., Zhang R.-Z., He C., Yang X.* The METTL3/MALAT1/PTBP1/USP8/TAK1 axis promotes pyroptosis and M1 polarization of macrophages and contributes to liver fibrosis // *Cell Death Discov.* 2021. Vol. 7, № 1. P. 368. DOI: 10.1038/s41420-021-00756-x
- Skat-Rørdam J., Højland Ipsen D., Lykkesfeldt J., Tveden-Nyborg P.* A role of peroxisome proliferator-activated receptor γ in non-alcoholic fatty liver disease // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2019. Vol. 124, № 5. P. 528–537. DOI: 10.1111/bcpt.13190
- Song L., Chen T., Zhao X., Xu Q., Jiao R., Li J., Kong L.* Pterostilbene prevents hepatocyte epithelial-mesenchymal transition in fructose-induced liver fibrosis through suppressing miR-34a/Sirt1/p53 and TGF- β 1/Smads signalling // *Br. J. Pharmacol.* 2019. Vol. 176, № 11. P. 1619–1634. DOI: 10.1111/bph.14573
- Staels B., Rubenstrunk A., Noel B., Rigou G., Delataille P., Millatt L.J., Baron M., Lucas A., Tailleux A., Hum D.W., Ratzju V., Cariou B., Hanf R.* Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor α/δ agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: *Hepatology* // *Hepatology*. 2013. Vol. 58, № 6. P. 1941–1952. DOI: 10.1002/hep.26461
- Streetz K.* Interleukin 6/gp130-dependent pathways are protective during chronic liver diseases // *Hepatology*. 2003. Vol. 38, № 1. P. 218–229. DOI: 10.1053/jhep.2003.50268
- Tang Y., He G., Huang S., Zhong K., Liao H., Cai L., Gao Y., Peng Z., Fu S.* The long noncoding RNA AK002107 negatively modulates miR-140-5p and targets TGFBR1 to induce epithelial–mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma // *Mol. Oncol.* 2019. Vol. 13, № 5. P. 1296–1310. DOI: 10.1002/1878-0261.12487
- Tao J., Xia L., Cai Z., Liang L., Chen Y., Meng J., Wang Z.* Interaction Between microRNA and DNA Methylation in Atherosclerosis // *DNA Cell Biol.* 2021. Vol. 40, № 1. P. 101–115. DOI: 10.1089/dna.2020.6138
- Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y. J., Nieto M.A.* Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease // *Cell*. 2009. Vol. 139, № 5. P. 871–890. DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.007
- Tian S., Zhou X., Zhang M., Cui L., Li B., Liu Y., Su R., Sun K., Hu Y., Yang F., Xuan G., Mab S., Zheng X., Zhou X., Guo C., Shang Y., Wang J., Han Y.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes protect against liver fibrosis via delivering miR-148a to target KLF6/STAT3 pathway in macrophages // *Stem Cell Res. Ther. BioMed Central Ltd*, 2022. Vol. 13, № 1. DOI: 10.1186/s13287-022-03010-y
- Tomita K.* Tumour necrosis factor signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice // *Gut*. 2006. Vol. 55, № 3. P. 415–424. DOI: 10.1136/gut.2005.071118
- Tu X., Zhang H., Zhang J., Zhao S., Zheng X., Zhang Z., Zhu J., Chen J., Dong L., Zang Y., Zhang J.* MICRORNA-101 suppresses liver fibrosis by targeting the TGF β signalling pathway // *J. Pathol.* 2014. Vol. 234, № 1. P. 46–59. DOI: 10.1002/path.4373
- Tzavlaki K., Moustakas A.* TGF- β Signaling // *Biomolecules*. 2020. Vol. 10, № 3. P. 487. DOI: 10.3390/biom10030487
- Wang B., Majumder S., Nuovo G., Kutay H., Volinia S., Patel T., Schmittgen T.D., Croce C., Ghoshal K., Jacob S.T.* Role of microRNA-155 at early stages of hepatocarcinogenesis induced by choline-deficient

- and amino acid-defined diet in C57BL/6 mice // *Hepatology*. 2009. Vol. 50, № 4. P. 1152–1161. DOI: 10.1002/hep.23100
- Wang D.-R., Wang B., Yang M., Liu Z., Sun J., Wang Y., Sun H., Xie L.-J. Suppression of miR-30a-3p Attenuates Hepatic Steatosis in Non-alcoholic Fatty Liver Disease // *Biochem. Genet.* 2020. Vol. 58, № 5. P. 691–704. DOI: 10.1007/s10528-020-09971-0
- Wang Q., Wei S., Li L., Bu Q., Zhou H., Su W., Liu Z., Wang M., Lu L. miR-139-5p sponged by LncRNA NEAT1 regulates liver fibrosis via targeting β -catenin/SOX9/TGF- β 1 pathway // *Cell Death Discov.* 2021a. Vol. 7, № 1. P. 243. DOI: 10.1038/s41420-021-00632-8
- Wang T., Zhang C., Meng X., Zhu B., Wang S., Yuan W., Zhang S., Xu J., Zhang C. Long Noncoding RNA Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1 in Extracellular Vesicles Promotes Hepatic Stellate Cell Activation, Liver Fibrosis and β -Catenin Signaling Pathway // *Front. Physiol.* 2022. Vol. 13. P. 792182. DOI: 10.3389/fphys.2022.792182
- Wang Y., Du J., Niu X., Fu N., Wang R., Zhang Y., Zhao S., Sun D., Nan Y. MiR-130a-3p attenuates activation and induces apoptosis of hepatic stellate cells in non-alcoholic fibrosing steatohepatitis by directly targeting TGFBR1 and TGFBR2 // *Cell Death Dis.* 2017. Vol. 8, № 5. P. e2792–e2792. DOI: 10.1038/cddis.2017.10
- Wang Y., Gao L. Monocyte-derived KCs (MoKCs) contribute to the KC pool in NASH // *Cell. Mol. Immunol.* Springer Nature, 2021. Vol. 18, № 3. P. 518–519. DOI: 10.1038/s41423-020-00606-3
- Wang Y., Mou Q., Zhu Z., Zhao L., Zhu L. MALAT1 promotes liver fibrosis by sponging miR181a and activating TLR4 NF- κ B signaling // *Int. J. Mol. Med.* 2021b. Vol. 48, № 6. P. 215. DOI: 10.3892/ijmm.2021.5048
- Wieckowska A., Papouchado B. G., Li Z., Lopez R., Zein N. N., Feldstein A. E. Increased Hepatic and Circulating Interleukin-6 Levels in Human Nonalcoholic Steatohepatitis // *Am. J. Gastroenterol.* 2008. Vol. 103, № 6. P. 1372–1379. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007.01774.x
- Wu M., Sun J., Wang L., Wang P., Xiao T., Wang S., Liu Q. The lncRNA HOTAIR via miR-17-5p is involved in arsenite-induced hepatic fibrosis through regulation of Th17 cell differentiation // *J. Hazard. Mater.* Elsevier B.V., 2023. Vol. 443. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.130276
- Wu Y.-Y., Wu S., Li X.-F., Luo S., Wang A., Yin S.-Q., Huang C., Li J. LncRNA MEG3 reverses CCl4-induced liver fibrosis by targeting NLRC5 // *Eur. J. Pharmacol.* 2021. Vol. 911. P. 174462. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174462
- Xu B., Gerin I., Miao H., Vu-Phan D., Johnson C. N., Xu R., Chen X.-W., Cawthorn W. P., MacDougald O. A., Koenig R. J. Multiple Roles for the Non-Coding RNA SRA in Regulation of Adipogenesis and Insulin Sensitivity // *PLoS ONE* / ed. Fadini G. P. 2010. Vol. 5, № 12. P. e14199. DOI: 10.1371/journal.pone.0014199
- Yamada H., Ohashi K., Suzuki K., Munetsuna E., Ando Y., Yamazaki M., Ishikawa H., Ichino N., Teradaira R., Hashimoto S. Longitudinal study of circulating miR-122 in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease // *Clin. Chim. Acta.* 2015. Vol. 446. P. 267–271. DOI: 10.1016/j.cca.2015.05.002
- Ye L., Zhao D., Xu Y., Lin J., Xu J., Wang K., Ye Z., Luo Y., Liu S., Yang, H. LncRNA-Gm9795 promotes inflammation in non-alcoholic steatohepatitis via NF-kappa B/JNK pathway by endoplasmic reticulum stress // *J. Transl. Med.* 2021a. Vol. 19, № 1. P. 101. DOI: 10.1186/s12967-021-02769-7
- Ye M., Wang S., Sun P., Qie J. Integrated MicroRNA Expression Profile Reveals Dysregulated miR-20a-5p and miR-200a-3p in Liver Fibrosis // *BioMed Res. Int.* / ed. Huang T. 2021. Vol. 2021b. P. 1–10. DOI: 10.1155/2021/9583932
- Yokomizo R., Yanaihara N., Yamaguchi N., Saito M., Kawabata A., Takahashi K., Takenaka M., Yamada K., Shapiro J. S., Okamoto A. MicroRNA-34a /IL-6R pathway as a potential therapeutic target for ovarian high-grade serous carcinoma // *Oncotarget.* 2019. Vol. 10, № 47. P. 4880–4893. DOI: 10.18632/oncotarget.27117
- Yu F., Chen B., Dong P., Zheng J. HOTAIR Epigenetically Modulates PTEN Expression via MicroRNA-29b: A Novel Mechanism in Regulation of Liver Fibrosis // *Mol. Ther.* 2017. Vol. 25, № 1. P. 205–217. DOI: 10.1016/j.ymthe.2016.10.015
- Yu F., Guo Y., Chen B., Dong P., Zheng J. MicroRNA-17-5p activates hepatic stellate cells through targeting of Smad7 // *Lab. Invest.* 2015b. Vol. 95, № 7. P. 781–789. DOI: 10.1038/labinvest.2015.58
- Yu F., Zheng J., Mao Y., Dong P., Lu Z., Li G., Guo C., Liu Z., Fan X. Long Non-coding RNA Growth Arrest-specific Transcript 5 (GAS5) Inhibits Liver Fibrogenesis through a Mechanism of Competing Endogenous RNA // *J. Biol. Chem.* 2015a. Vol. 290, № 47. P. 28286–28298. DOI: 10.1074/jbc.M115.683813
- Yu S., Matsusue K., Kashireddy P., Cao W.-Q., Yeldandi V., Yeldandi A. V., Rao M. S., Gonzalez F. J., Reddy J. K. Adipocyte-specific Gene Expression and Adipogenic Steatosis in the Mouse Liver Due to Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ 1 (PPAR γ 1) Overexpression // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 1. P. 498–505. DOI: 10.1074/jbc.M210062200
- Zaiou M. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ as a Target and Regulator of Epigenetic Mechanisms in Nonalcoholic Fatty Liver Disease // *Cells.* 2023. Vol. 12, № 8. P. 1205. DOI: 10.3390/cells12081205
- Zeng N., Huang R., Li N., Jiang H., Li R., Wang F., Chen W., Xia M., Wang, Q. MiR-451a attenuates free

- fatty acids—mediated hepatocyte steatosis by targeting the thyroid hormone responsive spot 14 gene // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2018. Vol. 474. P. 260–271. DOI: 10.1016/j.mce.2018.03.016
- Zeng Q., Liu C.-H., Wu D., Jiang W., Zhang N., Tang H. lncRNA and circRNA in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review // *Biomolecules.* 2023. Vol. 13, № 3. P. 560. DOI: 10.3390/biom13030560
- Zhang B., Yu L., Han N., Hu Z., Wang S., Ding L., Jiang J. LINC01116 targets miR-520a-3p and affects IL6R to promote the proliferation and migration of osteosarcoma cells through the Jak-stat signaling pathway // *Biomed. Pharmacother.* 2018. Vol. 107. P. 270–282. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.119
- Zhang D., Mou J., Wang F., Liu J., Hu X. CRNDE enhances neuropathic pain via modulating miR-136/IL6R axis in CCI rat models // *J. Cell. Physiol.* 2019d. Vol. 234, № 12. P. 22234–22241. DOI: 10.1002/jcp.28790
- Zhang J., Han C., Song K., Chen W., Ungerleider N., Yao L., Ma W., Wu T. The long-noncoding RNA MALAT1 regulates TGF- β /Smad signaling through formation of a lncRNA-protein complex with Smads, SETD2 and PPM1A in hepatic cells // *PLOS ONE* / ed. Buday L. 2020. Vol. 15, № 1. P. e0228160. DOI: 10.1371/journal.pone.0228160
- Zhang K., Han X., Zhang Z., Zheng L., Hu Z., Yao Q., Cui H., Shu G., Si M., Li C., Shi Z., Chen T., Han Y., Chang Y., Yao Z., Han T., Hong W. The liver-enriched lnc-LFAR1 promotes liver fibrosis by activating TGF β and Notch pathways // *Nat. Commun.* 2017. Vol. 8, № 1. P. 144. DOI: 10.1038/s41467-017-00204-4
- Zhang L., Lu X., Zhou X., Liu Q., Chen L., Cai F. NEAT1 induces osteosarcoma development by modulating the miR-339-5p/TGF- β 1 pathway // *J. Cell. Physiol.* 2019b. Vol. 234, № 4. P. 5097–5105. DOI: 10.1002/jcp.27313
- Zhang Q., Yu K., Cao Y., Luo Y., Liu Y., Zhao C. miR-125b promotes the NF- κ B-mediated inflammatory response in NAFLD via directly targeting TNFAIP3 // *Life Sci.* 2021. Vol. 270. P. 119071. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119071
- Zhang Q., Yu K., Cao Y., Luo Y., Liu Y., Zhao C. MicroRNA-378 promotes hepatic inflammation and fibrosis via modulation of the NF- κ B-TNF α pathway // *J. Hepatol.* 2019c. Vol. 70, № 1. P. 87–96. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.08.026
- Zhang Y.-Z., Yao J.-N., Zhang L.-F., Wang C.-F., Zhang X.-X., Gao B. Effect of NLRC5 on activation and reversal of hepatic stellate cells by regulating the nuclear factor- κ B signaling pathway // *World J. Gastroenterol.* 2019a. Vol. 25, № 24. P. 3044–3055. DOI: 10.3748/wjg.v25.i24.3044
- Zhang Z., Zha Y., Hu W., Huang Z., Gao Z., Zang Y., Chen J., Dong L., Zhang J. The Autoregulatory Feedback Loop of MicroRNA-21/Programmed Cell Death Protein 4/Activation Protein-1 (MiR-21/PDCD4/AP-1) as a Driving Force for Hepatic Fibrosis Development // *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288, № 52. P. 37082–37093. DOI: 10.1074/jbc.M113.517953
- Zhao J., Qi Y.-F., Yu Y.-R. STAT3: A key regulator in liver fibrosis // *Ann. Hepatol.* 2021. Vol. 21. P. 100224. DOI: 10.1016/j.aohep.2020.06.010
- Zhao N., Wang R., Zhou L., Zhu Y., Gong J., Zhuang S.-M. MicroRNA-26b suppresses the NF- κ B signaling and enhances the chemosensitivity of hepatocellular carcinoma cells by targeting TAK1 and TAB3 // *Mol. Cancer.* 2014. Vol. 13, № 1. P. 35. DOI: 10.1186/1476-4598-13-35
- Zheng J., Wu C., Lin Z., Guo Y., Shi L., Dong P., Lu Z., Gao S., Liao Y., Chen B., Yu F. Curcumin up-regulates phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 through micro RNA -mediated control of DNA methylation – a novel mechanism suppressing liver fibrosis // *FEBS J.* 2014. Vol. 281, № 1. P. 88–103. DOI: 10.1111/febs.12574
- Zhu C., Huang L., Xu F., Li P., Hu F. lncRNA PCAT6 promotes tumor progression in osteosarcoma via activation of TGF- β pathway by sponging miR-185-5p // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020. Vol. 521, № 2. P. 463–470. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.10.136
- Zhu D., Lyu L., Shen P., Wang J., Chen J., Sun X., Chen L., Zhang L., Zhou Q., Duan Y. rSjP40 protein promotes PPAR γ expression in LX-2 cells through microRNA-27b // *FASEB J.* 2018. Vol. 32, № 9. P. 4798–4803. DOI: 10.1096/fj.201700520RR
- Zizzo G., Cohen P.L. The PPAR- γ antagonist GW9662 elicits differentiation of M2c-like cells and upregulation of the MerTK/Gas6 axis: a key role for PPAR- γ in human macrophage polarization // *J. Inflamm.* 2015. Vol. 12, № 1. P. 36. DOI: 10.1186/s12950-015-0081-4

Non-coding RNAs involved in the regulation of signaling pathways as possible markers of non-alcoholic fatty liver disease progression

© 2023 L. V. Topchieva^{1, #}, I. V. Kurbatova¹, O. P. Dudanova²,
A. V. Vasilyeva¹, G. A. Zhulay¹

¹*Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, 198910, Russia, Petrozavodsk, st. Pushkinskaya, 11*

²*Petrozavodsk State University, 185910, Russia, Petrozavodsk, st. Lenina, 33*

[#]*E-mail: topchieva67@mail.ru*

The current understanding of the role of non-coding RNAs in the regulation of signaling pathways that control lipid accumulation and the development of inflammation in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is outlined. The contribution of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) to changes in lipid metabolism and the formation of lipotoxicity as trigger mechanisms of NAFLD is considered. The role of TGF β , TNF α /NF- κ b, IL-6/JAK/STAT3 signaling pathways in the activation of stellate cells, liver fibrogenesis and the progression of NAFLD has been demonstrated. Analysis of literature data has revealed a number of microRNAs and long non-coding RNAs (lncRNAs), the expression of which may be associated with the regulation of these signaling pathways in this disease. They may probably have prognostic significance for differentiating clinical forms and severity of NAFLD.

Keywords: non-alcoholic fatty liver disease, non-coding RNAs, signaling pathways

УДК 579.6

УСТОЙЧИВЫЕ К ВОЗДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ PGPR ШТАММЫ *PSEUDOMONAS* SP., СТИМУЛИРУЮЩИЕ РОСТ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ ПРИ КАДМИЕВОМ СТРЕССЕ

© 2024 г. О. В. Чубукова*, @, Л. Р. Хакимова*, Р. Т. Матниязов*, З. Р. Вершинина* **

*Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение

Федерального государственного бюджетного научного учреждения

Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук,

"росп. Октября, 71, Уфа, 450054 Россия

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Уфимский государственный нефтяной технический университет», ул. Космонавтов, 1, Уфа, 450000 Россия

@E-mail: chubukova@bk.ru

Поступила в редакцию 17.11.2023 г.

После доработки 01.03.2024 г.

Принята к публикации 03.03.2024 г.

Из почвы, загрязненной химическими отходами, были выделены и исследованы три штамма бактерий рода *Pseudomonas*, обладающие устойчивостью к тяжелым металлам. В результате анализа генов 16S рРНК и *rpoD* штамм *Pseudomonas* sp. 17 НМ был идентифицирован как *Pseudomonas capeferrum*, а штаммы *Pseudomonas* sp. 65 НМ и 67 НМ оказались наиболее близки к типовым штаммам *Pseudomonas silesiensis* и *Pseudomonas umsongensis*. соответственно. Было показано, что штаммы *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ, 67 НМ характеризуются разным уровнем устойчивости к тяжелым металлам: максимальная толерантная концентрация (МТК) цинка составила 1 мМ для всех штаммов, кадмия 1, 1.5, 1 мМ, свинца 5, 5, 4 мМ, никеля 7, 9, 7 мМ, соответственно. Все штаммы псевдомонад могут формировать биопленки и обладают свойствами PGPR-бактерий. Обработка семян люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) штаммами *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ, 67 НМ в условиях кадмиевого стресса приводила к повышению сухой биомассы проростков люцерны до 40% и увеличению содержания хлорофилла *a* и *b* в листьях на 25–33% относительно контроля.

Ключевые слова: PGPR-штаммы, род *Pseudomonas*, ген 16S рРНК, ген *rpoD*, кадмиевый стресс, максимальная толерантная концентрация, тяжелые металлы

DOI: 10.31857/S1026347024050037, **EDN:** ulutlw

В настоящее время в результате растущей техногенной нагрузки актуальной проблемой сельского хозяйства является загрязнение почвы, снижение урожайности растений и качества аграрной продукции. На сегодняшний день одними из наиболее опасных экополлютантов являются тяжелые металлы (ТМ), такие как свинец (Pb), кадмий (Cd), ртуть (Hg), хром (Cr), цинк (Zn) и другие (Choudhury, Chatterjee, 2022). Ряд ТМ (молибден (Mo), железо (Fe), медь (Cu), марганец (Mn), цинк (Zn), никель (Ni), кобальт (Co)) в микроколичествах необходимы для функционирования растений и микроорганизмов. Другие, такие как Cd, Pb, Hg и Ag не выполняют никакой биологической функции и токсичны уже в микродозах (Raklami *et al.*, 2022). ТМ не поддаются разложению и способны накапливаться во всех звеньях пищевой цепи, что приводит к снижению роста и урожайности растений, к опасным

заболеваниям человека и животных (Pande *et al.*, 2022). Одним из многообещающих подходов к решению данных проблем является использование стимулирующих рост растений бактерий (PGPR), (plant growth-promoting rhizobacteria), которые колонизируют корни растения и способны улучшить его рост как в нормальных, так и в стрессовых условиях путем синтеза антимикробных и антигрибных соединений, органических кислот, гормонов, сидерофоров, фосфатмобилизирующих свойств и других процессов (Wang *et al.*, 2022). Также PGPR бактерии, обладающие устойчивостью к ТМ, могут снизить токсическую нагрузку на растения за счет различных механизмов: биосорбции, биоаккумуляции, биотрансформации и биоминерализации (Raklami *et al.*, 2022).

По данным литературы значительная часть ризосферных микроорганизмов представлена

грамотрицательными бактериями *Pseudomonas* sp. (Berendsen *et al.*, 2015). Представители данного рода отличаются высокой конкурентоспособностью и метаболической активностью, среди них описаны штаммы *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. protegens*, *P. klonensis*, обладающие PGPR свойствами (Gu *et al.*, 2020; Чубукова и др., 2022). Биодоброения на основе PGPR штаммов *Pseudomonas* sp. активно применяют в агротехнологиях для повышения урожайности сельскохозяйственных культур, поддержания продуктивности почвы и снижения доли вносимых химических удобрений (Singh *et al.*, 2022). В различных исследованиях также продемонстрированы примеры успешного применения PGPR штаммов псевдомонад для улучшения роста растений в почвах, загрязненных ТМ. Описана работа, в которой обработка растений томата (*Lycopersicon esculentum*), штаммом *Pseudomonas aeruginosa*, в условиях кадмиевого загрязнения вызвала улучшение ростовых параметров, повышение содержания фотосинтетических пигментов и снижение накопления Cd в тканях растения (Khanna *et al.*, 2019). В работе (Manzoog *et al.*, 2019) было показано, что в результате инокуляции штаммом *Pseudomonas* sp. strain PG-12 папоротника *Pteris vittata*, растущего на среде, загрязненной Pb, происходило улучшение фосфорного питания, роста и уменьшение содержания Pb в опытных растениях в сравнении с контролем. Штамм *Pseudomonas putida* SFB3 показал высокую устойчивость к нескольким ТМ (Cd, Cu, Pb, Ni, Zn) и способность улучшать всхожесть и ростовые характеристики вигны лучистой (*Vigna radiata*) в условиях загрязнения указанными поллютантами (Saif, Khan, 2017). Подобные штаммы могут быть использованы в качестве биодоброения для выращивания агрокультур на почвах с небольшим загрязнением ТМ.

Для сельского хозяйства перспективным представляется применение многофункциональных штаммов *Pseudomonas* sp., сочетающих ростостимулирующие свойства и устойчивость к ТМ, которые в перспективе могут способствовать увеличению биомассы растений и усилить защитные свойства растений в условиях загрязнения ТМ.

Целью данной работы был поиск устойчивых к ТМ штаммов *Pseudomonas* sp., выделенных из загрязненных почв, и исследование ростостимулирующих и защитных свойств данных микроорганизмов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение чистых культур микроорганизмов из образцов почвы. Объектом исследования являлись микроорганизмы, выделенные из образцов почв, собранных в районе химического завода в г. Уфа. Для получения бактериальных изолятов

навески почв гомогенизировали в стерильной среде LB (масс. % в водном растворе: бактотриптон — 1, дрожжевой экстракт — 0.5, NaCl — 0.5). Инкубировали на качалке при комнатной температуре и 160 об/мин, через 30 мин отбирали надосадочную жидкость из которой готовили серию десятикратных разведений. Из разведений в 10^4 и 10^5 по 100 мкл рассеивали на чашки с агаризованной средой LB, содержащие Pb^{2+} и Ni^{2+} (с использованием солей $Pb(CH_3COO)_2$ и $NiCl_2$, соответственно) в концентрации 3 мМ и выращивали в течение 5 дней при температуре 28°C (Desoky *et al.*, 2020). Выросшие отдельные колонии пересевали и культивировали на чашках при 28°C и 37°C для исключения потенциальных патогенов человека и животных. Дальнейшие исследования проводились на штаммах с температурой роста при 28°C. Бактериальные изоляты пересевали на агаризованную среду LB без ТМ и выращивали сутки при 28°C.

Максимальную толерантную концентрацию (МТК) к Cd, Ni, Zn, Pb определяли на агаризованной питательной среде Nutrient Broth (NB) (масс. % в водном растворе: бактотриптон — 0.5, мясной экстракт — 0.15, дрожжевой экстракт — 0.15, NaCl — 0.5, агар — 0.1) с возрастающими концентрациями ТМ (Mtengai *et al.*, 2022). Для этого предварительно стерилизованные растворы солей $CdCl_2$, $NiCl_2$, $ZnSO_4$, $Pb(CH_3COO)_2$ в различных концентрациях добавляли к среде NB с агаром сразу после автоклавирования. МТК определяли как максимальную концентрацию металла в среде, при которой еще наблюдался рост колоний на чашках с агаром. Контролем служила среда без добавления ТМ. Штаммы выращивали на чашках при 28°C в течение 5 суток.

ДНК из бактерий выделяли лизированием клеток в 1% Triton X100 и 1% — ной суспензии Chelex100. Надосадочную жидкость брали в качестве матрицы для ПЦР (Чубукова и др., 2022).

Молекулярно-генетическая идентификация бактериальных штаммов. Генетическое разнообразие собранных изолятов исследовали с помощью RAPD анализа (Random Amplified Polymorphic DNA) с использованием следующих “случайных” праймеров: 1) LMBD 5'-GGGCGCTG-3'; 2) AFK 5'-ACGGTGGACG-3' (Чубукова и др., 2022).

Для амплификации гена 16S рРНК были использованы универсальные праймеры fD1 5'-CCCGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3' и rD1 5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', фланкирующие фрагмент гена размером около 1500 пн (Чубукова и др., 2022). Для амплификации фрагмента гена *rpoD* были использованы праймеры PsEG30F 5'-ATYGAAATCGCCAARCG-3' и PsEG790R 5'-CGGTTGATKTCCTTGA-3' с размером продукта 760 п.н. (Mulet *et al.*, 2009).

Определение нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе

Applied Biosystems 3500 фирмы “Applied Biosystems, Inc.” (США) с использованием наборов “Big Dye Terminator v. 3.1”.

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакета компьютерных программ Lasergene фирмы “DNASTAR, Inc.” (США). Нуклеотидные последовательности для сравнительного анализа были взяты из базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием метода множественного выравнивания Clustal W в программе Megalign Lasergene (DNASTAR, США).

Статистическую достоверность ветвления (bootstrap-анализ) оценивали с использованием соответствующей функции программы Megalign на основе 1000 альтернативных деревьев.

Анализ бактериальных биопленок, формируемых на инертных поверхностях. Для получения биопленок использовали среду LB, YM (масс. % в водном растворе: маннитол — 1, дрожжевой экстракт — 0.04, NaCl — 0.01, $MgSO_4$ — 0.01, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — 0.05, агар — 1) и МН (масс. % в водном растворе: кислый казеиновый пептон — 1.75, крахмал — 0.15, вытяжка из говядины — 0.2) с применением 24-луночных пластиковых планшетов (полистирол) (“Corning Inc.”, США) согласно методике (Чубукова и др., 2022). Для определения относительных показателей плотности биопленки использовали метод окрашивания генцианом фиолетовым (“Агат-Мед”, Россия) (Чубукова и др., 2022). Оптическую плотность образцов измеряли с помощью прибора Enspire Model 2300 Multilabel Microplate Reader (“Perkin Elmer”, США).

Микроскопирование корней растений. Для исследования способности бактерий формировать биопленки на корнях растений штаммы *Pseudomonas* sp. были трансформированы ранее сконструированной генетической конструкцией на основе вектора pJN105, в которую был добавлен ген флуоресцентного белка TurboRFP (Баймиев и др., 2011). Полученными флуоресцентными штаммами псевдомонад были обработаны корни проростков люцерны.

Подготовка электрокомпетентных клеток и их трансформация, а также электрофорез фрагментов ДНК проводились согласно (Sambrook, 1989).

Стерильные семена люцерны посевной (*Medicago sativa*, L.) проращивали в течение 7 дней на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри. Далее проростки выдерживали при покачивании (50 об./мин) в суспензии бактерий (10^6 КОЕ/мл) в течение суток. Для приготовления суспензий использовали суточные культуры бактерий, выращенные в жидкой среде LB.

Визуальное наблюдение меченых микроорганизмов на корнях растений проводили на флуоресцентном микроскопе AxioImagerM1 (“CarlZeiss”, Германия).

Исследование влияния бактерий на рост растений.

Семена растений люцерны посевной стерилизовали в течение 1 мин в 70% спирте, затем 20 мин в 5% растворе гипохлорита натрия и промывали несколько раз стерильной водой. Далее семена выдерживали в течение 30 мин в воде (контроль) или в суточной суспензии бактерий, которые предварительно выращивали на качалках в жидкой среде LB до концентрации 10^8 КОЕ/мл и разводили до концентрации 10^6 КОЕ/мл. Семена (100 штук) выращивали на смоченной водой фильтровальной бумаге в течение 3 сут при комнатной температуре в темноте. Аналогично выращивали в стрессовом варианте опыта семена без обработки и с обработкой бактериями на фильтровальной бумаге, смоченной раствором $CdCl_2$ в концентрации 0.5 мМ. Далее проросшие семена выращивали при естественном освещении в дистиллированной воде или в стрессовом варианте опыта в растворе $CdCl_2$ в концентрации 0.5 мМ в течение 7 сут. Часть растений использовали для определения содержания фотосинтетических пигментов, у остальных контрольных и опытных растений измеряли сухую биомассу. Для этого растения целиком высушивали в сушильном шкафу до постоянного веса, а затем взвешивали.

Определение содержания фотосинтетических пигментов. Экстракцию и определение содержания пигментов в растительных тканях проводили согласно (Maslennikova *et al.*, 2022). Для этого листья растений (0.05 г) гомогенизировали в 90% этаноле (10 мл) с добавлением $CaCO_3$ и фильтровали. Оптическую плотность отфильтрованных экстрактов измеряли с помощью спектрофотометра SmartSpec™ Plus spectrophotometer (Bio–Rad, США) при 663 (Хл а), 646 (Хл b).

Выявление фосфатмобилизующей активности при росте бактерий на агаризованной питательной среде. Анализ способности штаммов *Pseudomonas* sp. к мобилизации неорганического фосфора проводили по определению площади зоны просветления (гало) вокруг колоний через 1–4 сут на чашках со средой Муромцева (масс. % в водном растворе: глюкоза — 1, аспарагин — 1, K_2SO_4 — 0.02, $MgSO_4$ — 0.02, кукурузный экстракт — 0.002, агар — 2; pH 6.8), содержащей нерастворимый фосфат. В качестве источника фосфора в среду добавляли $Ca_3(PO_4)_2$ в концентрации 5 г/л (Чубукова и др., 2022).

Определение способности бактерий синтезировать индолил-3-уксусную кислоту (ИУК). Для изучения способности микроорганизмов синтезировать ауксины их выращивали на среде LB с добавлением 1 мг/мл триптофана в течение 5 сут, после чего культуру центрифугировали 5 мин при 1300 об/мин. Затем к супернатанту добавляли реактив Сальковского (2 мл 0.5 М раствора $FeCl_3$ и 100 мл 37% $HClO_4$) в соотношении 1:2 и выдерживали в темноте в течение 30 мин. Определение уровня

ауксинов в супернатанте проводили колориметрическим методом по калибровочной кривой, построенной с использованием растворов ИУК с концентрацией 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50 мкг/мл с помощью планшетного спектрофотометра Enspire Model 2300 Multilabel Microplate Reader (“Perkin Elmer”, США) при 535 нм (Maslennikova *et al.*, 2022).

Определение сидерофорной активности. Продукцию сидерофоров определяли, используя универсальный метод, с применением минимальной среды с CAS-реактивом (синий агар) (Maslennikova *et al.*, 2022). Бактерии выращивали на чашках с «синим» агаром в течение 7 дней. Появление желтого «гало» вокруг колонии выявляло выделение сидерофоров.

Статистическая обработка результатов. Эксперименты проводили в 4-кратной повторности и каждый независимо воспроизводили не менее 3 раз.

Результаты обрабатывали с использованием пакета Microsoft Office Excel 2010, доверительные интервалы определяли для 95% уровня значимости.

Депонирование штаммов. Последовательности исследованных штаммов были зарегистрированы в базе данных GenBank под номерами ON892076, ON892493, ON892495 для гена 16S рРНК и ON993895, OP019022, OP019023 для гена *rpoD*, соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из загрязненной почвы нами было выделено и исследовано 120 изолятов бактерий, выросших на среде с ТМ. Из них было отобрано 70 изолятов с оптимальной температурой роста 28°C. Для идентификации штаммов псевдомонад из различных природных образцов ранее М. Мюлет с соавторами предложили использовать ПЦР с применением разработанных ими высокоселективных праймеров (PsEG30F и PsEG790R), специфичных к консервативным регионам гена *rpoD* бактерий *Pseudomonas* sp., кодирующего бактериальный фактор инициации транскрипции (Mulet *et al.*, 2009; Lalucat *et al.*, 2020). ПЦР анализ бактериальных изолятов с указанными праймерами выявил ожидаемый продукт в размере 760 п.н. у трех штаммов. Отобранные чистые культуры изучаемых микроорганизмов предварительно проверяли на гетерогенность с помощью RAPD-анализа с применением “произвольных” олигонуклеотидных праймеров AFK и LMBD.

Для определения филогенетической принадлежности данных штаммов было проведено исследование нуклеотидной последовательности фрагментов консервативных генов *rpoD* и 16S рРНК и сравнительный анализ с другими аналогичными генами из базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). В настоящее время принято

считать, что для видовой идентификации бактерий сравнительный анализ генов 16S рРНК обладает недостаточной дискриминирующей способностью вследствие небольшого числа замен в нуклеотидной последовательности данного гена. Это особенно актуально для бактерий рода *Pseudomonas*, включающего более 200 видов, многие из которых филогенетически очень близки (Lalucat *et al.*, 2020). В отличие от гена 16S рРНК ген *rpoD* представлен у бактерий в одной копии, и его последовательность отличается значительной вариабельностью вследствие высокой эволюционной изменчивости. Во многих исследованиях показано, что для бактерий рода *Pseudomonas* филогенетический анализ гена *rpoD* в сравнении с геном 16S рРНК обладает большей разрешающей способностью для идентификации изолятов до вида (Mulet *et al.*, 2010; Lalucat *et al.*, 2020).

Анализ последовательностей генов 16S рРНК и *rpoD* позволил отнести все три исследуемых штамма, получившие название 17 НМ, 65 НМ и 67 НМ, к роду *Pseudomonas*. На филогенетических деревьях, построенных на основе сравнения последовательностей вышеуказанных генов типовых штаммов псевдомонад и трех идентифицируемых штаммов, последние разделились на три обособленные группы (рис. 1, 2). На древе сходства генов 16S рРНК штамм *Pseudomonas* sp. 17 НМ показал очень высокий уровень гомологии с типовыми штаммами *Pseudomonas capeferrum* WCS358^T и *Pseudomonas putida* ATCC 12633^T (99.4% и 99.6%, соответственно), тогда как его сходство по гену *rpoD* с указанными штаммами составило 99.7% и 85.9%, соответственно. Таким образом, на основании полученных данных штамм *Pseudomonas* sp. 17 НМ можно идентифицировать как *P. capeferrum*. Штамм *Pseudomonas* sp. 65 НМ на 16S рРНК и *rpoD*-дендрограммах оказался наиболее близок к типовому штамму *Pseudomonas silesiensis* A3^T (99.7% и 96.7%, соответственно), а *Pseudomonas* sp. 67 НМ к типовому штамму *Pseudomonas umsongensis* LMG 21317^T (98.6% и 95.6%, соответственно). Охарактеризованные штаммы были депонированы в коллекции микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН «Симбионт».

По ранее полученным данным сравнительного анализа генов 16S рРНК и *rpoD* род *Pseudomonas* можно разделить на три основные группы: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas pertucinogena* и *Pseudomonas fluorescens* (Lalucat *et al.*, 2020; Girard *et al.*, 2020). Секвенирование вышеуказанных генов выявило, что штаммы *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ и 67 НМ с большой вероятностью можно отнести к видам *P. capeferrum*, *P. silesiensis*, *P. umsongensis*, соответственно, которые входят в группу *P. fluorescens*. Сообщалось, что представители данных видов в большинстве случаев были выделены из почв и многие из них обладали

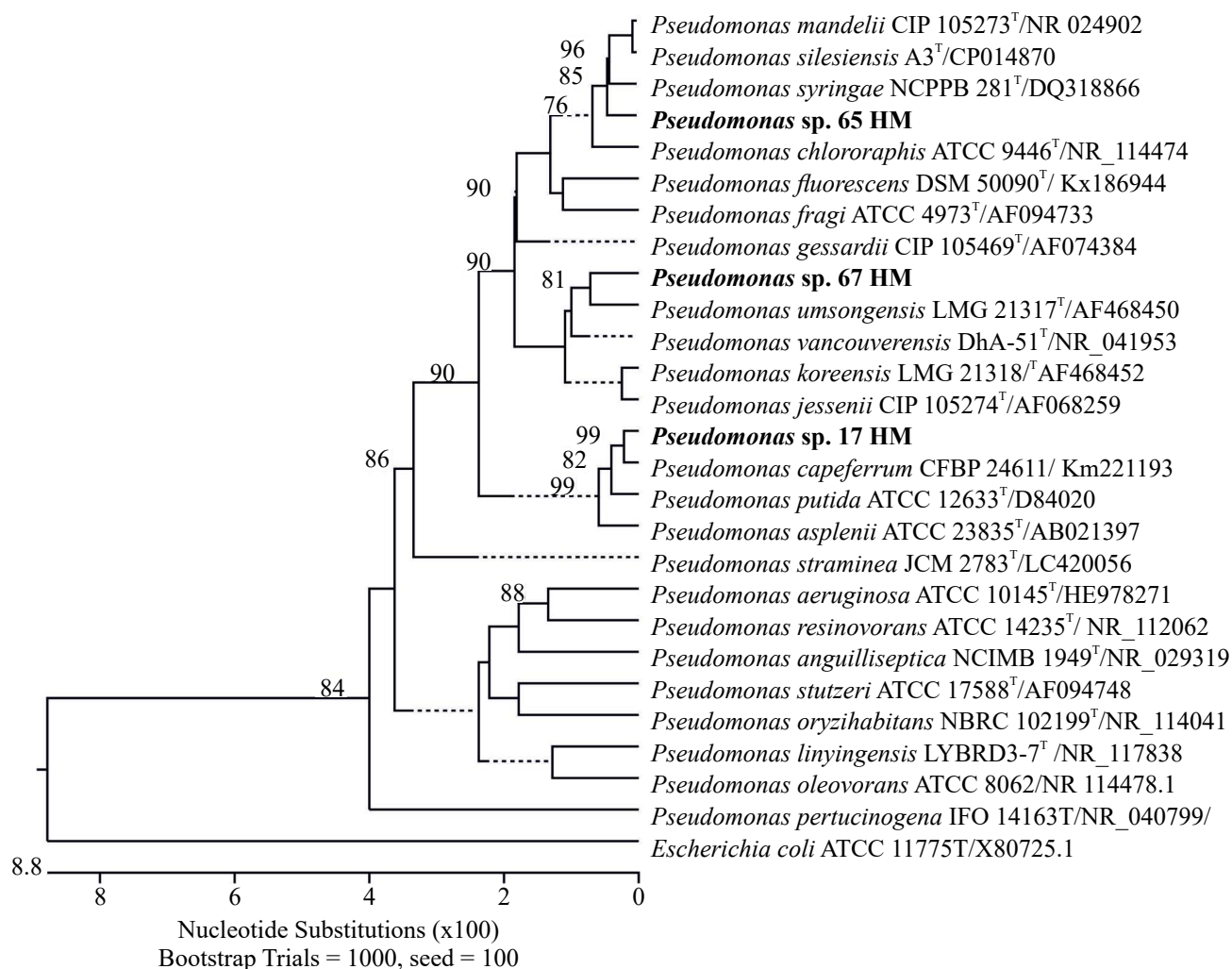


Рис. 1. Филогенетическое дерево бактерий, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена 16S рРНК. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа (показаны величины показателя “bootstrap”-анализа от 70%). На горизонтальной оси приведен вес данного выравнивания, выраженный в количестве замен нуклеотидов ($\times 100$). В качестве внешней группы использована нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК *E. coli* ATCC 11775T.

свойствами PGPR бактерий, а также способностью к биоаккумуляции и биodeградации загрязняющих веществ (Berendsen *et al.*, 2015; Kaminski *et al.*, 2018; Narancic *et al.*, 2021).

Анализ металлорезистентности бактериальных штаммов. При культивировании штаммов *Pseudomonas* sp. 17 HM, 65 HM и 67 HM на питательной агаризованной среде NB с ТМ было установлено, что исследуемые бактерии характеризуются разным уровнем устойчивости к токсическому действию Cd, Ni, Pb, Zn (табл. 1). Минимальный уровень резистентности все три штамма псевдомонад показали к Zn и Cd; МТК цинка составил 1 мМ для трех штаммов, а МТК кадмия – 1, 1.5 и 1 мМ для штаммов *Pseudomonas* sp. 17 HM, 65 HM и 67 HM, соответственно. Значительную резистентность

все штаммы проявили к Pb; МТК штаммов *Pseudomonas* sp. 17 HM, 65 HM и 67 HM составила 5, 5, 4 мМ, соответственно. Наиболее высокую резистентность исследуемые штаммы псевдомонад проявили к Ni, причем наилучшие показатели были у *Pseudomonas* sp. 65 HM (МТК 9 мМ).

Таким образом, анализ роста бактерий на твердых средах показал, что штаммы *Pseudomonas* sp. 17 HM, 65 HM и 67 HM отличаются повышенной резистентностью к Ni и Pb, и низким уровнем резистентности к Zn и Cd, что вероятно связано с различными механизмами устойчивости исследованных микроорганизмов к определенному ТМ. Полученные результаты соответствуют данным других исследований, в которых была выявлена подобная шкала устойчивости к ТМ у различных

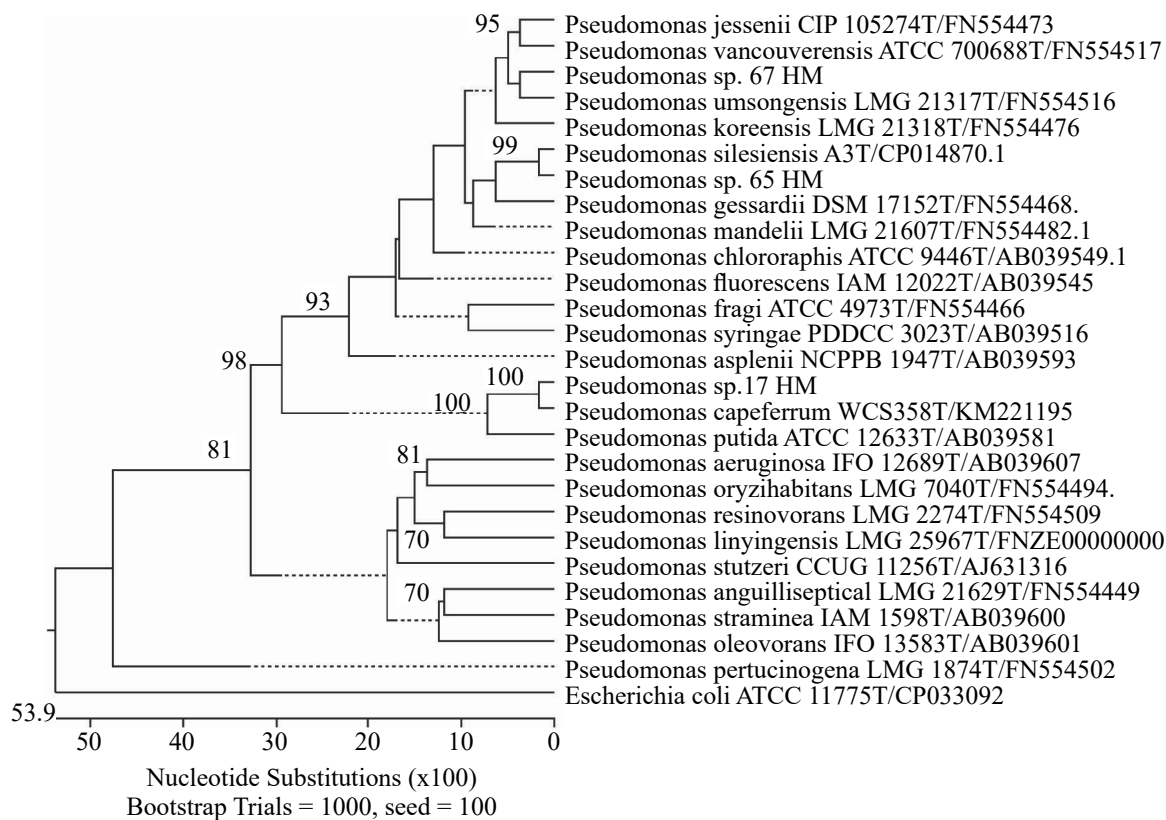


Рис. 2. Филогенетическое древо бактерий, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена *rpoD*. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа (показаны величины показателя “bootstrap”-анализа от 70%). На горизонтальной оси приведен вес данного выравнивания, выраженный в количестве замен нуклеотидов (×100). В качестве внешней группы использована нуклеотидная последовательность гена *rpoD* *E. coli* ATCC 11775T.

штаммов *Pseudomonas* sp., выделенных из донных отложений и почвы (Akinbowale *et al.*, 2007),

В целом, наиболее высокая резистентность к большинству исследованных ТМ была выявлена у штамма *Pseudomonas* sp. 65 HM. Подобные устойчивые штаммы могут быть использованы в биоремедиации, например, в качестве биосорбентов для удаления Ni и Pb из загрязненной воды, почвы, промышленных отходов. Ранее сообщалось о эффективной биосорбции Pb из сточных вод почвенной психротрофной бактерией *Pseudomonas* sp. I3, с минимальной ингибирующей концентрацией Pb²⁺ 7,5 мМ (Li *et al.*, 2017). У штамма *Pseudomonas aeruginosa* Zambia SZK17 Kabwe1 с множественной устойчивостью к ТМ, включая Ni²⁺ в концентрации до 2 мМ, была показана способность к их удалению из жидкой среды (Mtengai *et al.*, 2022). В исследовании (Patel *et al.*, 2006) описан штамм *Pseudomonas fragi*, способный к максимальной аккумуляции Ni в присутствии 2 мМ данного ТМ в среде.

Исследование биоуплотнения штаммами *Pseudomonas* sp. Устойчивость к ТМ выше у бактерий, организованных в биоуплотнения – специализированные

структуры, позволяющие им адаптироваться к меняющимся или неблагоприятным условиям окружающей среды (Pande *et al.*, 2022). Бактериальные биоуплотнения являются особенно эффективными для биоремедиации различных сред (почв, воды), загрязненных экоплютантами, из-за высокой микробной биомассы и лучшей, в сравнении с планктонными клетками, способности к биоаккумуляции и биосорбции различных соединений (Choudhury, Chatterjee, 2022).

Нами была изучена способность штаммов *Pseudomonas* sp. 17 HM, 65 HM и 67 HM к биоуплотнению

Табл.1. Максимальные толерантные концентрации (МТК) тяжелых металлов исследованных штаммов бактерий

Штамм <i>Pseudomonas</i> sp.	МТК, мМ			
	Cd	Ni	Pb	Zn
17 HM	1	7	5	1
65 HM	1.5	9	5	1
67 HM	1	7	4	1

образованию в различных средах на инертных поверхностях. Исследования показали, что все три штамма почвенных псевдомонад формировали зрелые биопленки на поверхности пластиковых планшетов как в богатых, так и в бедных питательных средах (рис. 3).

Также, применение бактериального препарата на основе резистентных к ТМ PGPR штаммов для фиторемедиации или в качестве биоудобрения будет значительно эффективнее при активной колонизации данными бактериями корневой поверхности растения, сопровождающейся образованием биопленок.

Анализ колонизации корней 7-дневных проростков люцерны после суток совместного инкубирования с флуоресцентными штаммами *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ, 67 НМ показал успешное формирование биопленок на корневой поверхности, а также на корневых волосках растений (рис.4).

Исследование PGPR свойств штаммов псевдомонад. К механизмам прямого положительного влияния PGPR бактерий на растения относится способность синтезировать фитогормоны и улучшать фосфорное питание растений, за счет повышения доступности в ризосфере соединений фосфора (Raklami *et al.*, 2022).

Одним из известных регуляторов роста, вырабатываемых псевдомонадами, является индолил-3-уксусная кислота (ИУК), которая стимулирует рост и развитие корневой системы, а также может влиять на поглощение и транслокацию ТМ растениями (Chen *et al.*, 2017). У всех проанализированных штаммов *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ, 67 НМ, была выявлена способность к синтезу ауксинов, соответствующая значению 5 мкг/мл.

Исследование способности растворять неорганический фосфат в виде фосфата кальция в питательной среде показало, что штаммы *Pseudomonas* sp.

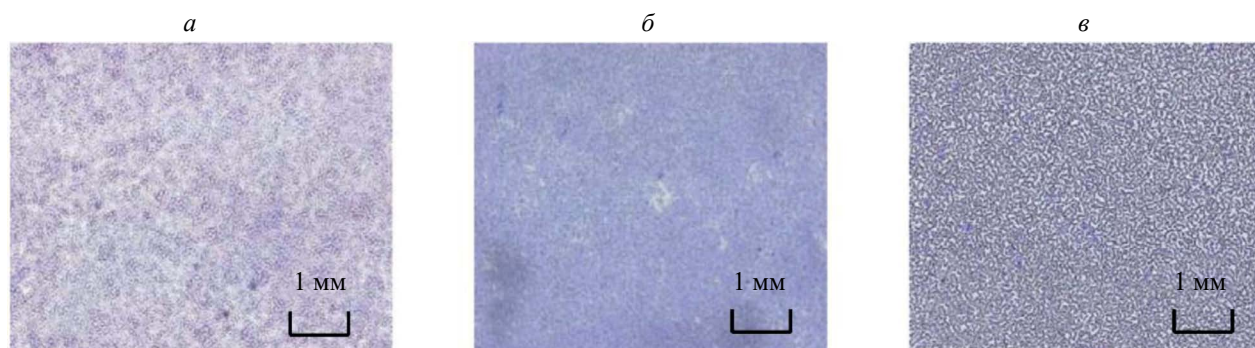


Рис. 3. Биопленки, образуемые штаммами *Pseudomonas* sp. на поверхности планшета через 7 дней культивирования: а – *Pseudomonas* sp. 17 НМ, среда LB; б – *Pseudomonas* sp. 65 НМ, среда YM; в – *Pseudomonas* sp. 67 НМ, среда MH.

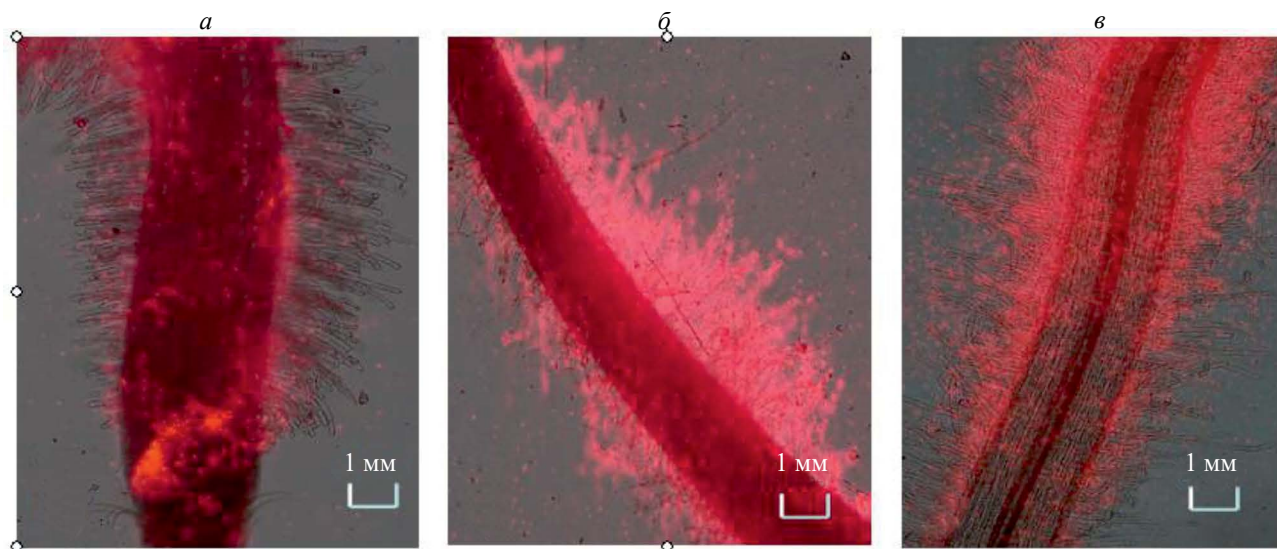


Рис. 4. Образование биопленок на поверхности корней проростков люцерны через 24 ч совместного культивирования: а – *Pseudomonas* sp. 17 НМ; б – *Pseudomonas* sp. 65 НМ; в – *Pseudomonas* sp. 67 НМ.

17 НМ, 65 НМ, 67 НМ обладают фосфатмобилизующей активностью. Причем лучшая мобилизация $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ наблюдалась у штамма *Pseudomonas* sp. 17 НМ (рис. 5).

К непрямым механизмам положительного воздействия бактерий на растения можно отнести продукцию сидерофоров, низкомолекулярных соединений, эффективно связывающих трехвалентное железо (Fe^{3+}) из почвы в комплексы, которые далее поступают в клетки бактерий. Таким образом, сидерофор-продуцирующие ризосферные бактерии, конкурируя за железо, замедляют рост фитопатогенных грибов и улучшают рост растения (Maslennikova *et al.*, 2022). Сидерофорная активность была выявлена у штаммов *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ, 67 НМ.

Влияние штаммов псевдомонад на ростовые показатели и содержание фотосинтетических пигментов в листьях люцерны посевной в нормальных условиях и в присутствии кадмия. Люцерна является важной бобовой кормовой культурой, отличающейся высокой урожайностью, пищевой ценностью и способностью к повышению продуктивности почвы. Поэтому большое значение имеет исследование способов снижения токсического действия ТМ на данное растение.

Кадмий считается одним из наиболее токсичных ТМ, действие которого в отношении растений проявляется в ингибировании роста, фотосинтеза, снижении урожайности (Khanna *et al.*, 2019). Ранее нами было показано, что Cd^{2+} в концентрации 0.5 мМ оказывал выраженный токсический эффект на проростки люцерны и гороха, тогда как обработка семян штаммом *Pseudomonas* sp. 2.4.1 снижала влияние кадмиевого стресса у инокулированных растений (Khakimova *et al.*, 2023; Хакимова и др., 2022).

В нашем исследовании обработка семян люцерны посевной штаммами *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ, 67 НМ в нормальных условиях приводила к прибавке сухой массы в 20–22% относительно контрольных, необработанных растений (рис. 6а).

Анализ сухой биомассы 7 суточных растений люцерны показал, что кадмиевый стресс закономерно снижал сухую биомассу растений почти в 2 раза по сравнению с нормальными условиями роста. Предобработка штаммами псевдомонад в стрессовых условиях приводила к повышению сухой биомассы люцерны на 25–40 % относительно необработанного контроля (рис. 6б).

Обработка семян штаммами *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ, 67 НМ в нормальных условиях привела к сбалансированному увеличению содержания хлорофилла *a* (Хл *a*) на 5–9% и хлорофилла *b* (Хл *b*) на 14–21 % в листьях люцерны, а сумма данных пигментов в этих растениях была на 7–11% выше уровня контрольных необработанных растений (табл. 2).

В условиях кадмиевого загрязнения в обработанных растениях содержание Хл *a* было на 31–38%, а Хл *b* на 10–30% выше уровня контрольного

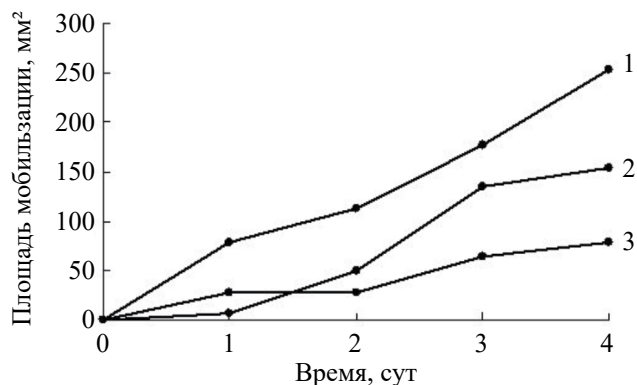


Рис. 5. Динамика мобилизации неорганического фосфата штаммами *Pseudomonas* sp.: 1 — 17 НМ; 2 — 67 НМ; 3 — 65 НМ. По оси абсцисс — сутки, на которые измеряли площадь мобилизации фосфата; по оси ординат — значения площади зон мобилизации фосфата в мм².

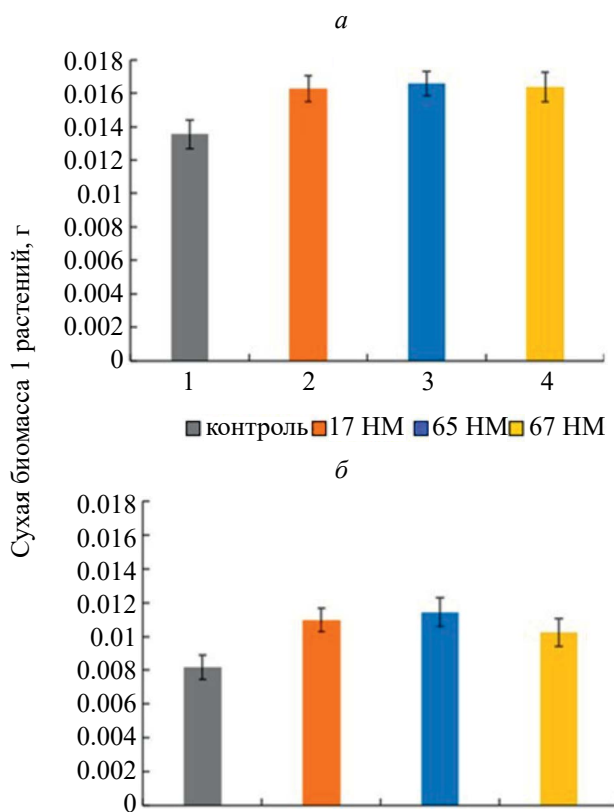


Рис. 6. Влияние штаммов *Pseudomonas* sp. на сухую биомассу растений люцерны посевной (по оси ординат изменение сухой биомассы растений в г при нормальных условиях (а) и в условиях кадмиевого стресса (б). Обозначения штаммов *Pseudomonas* sp. (1–4): 1 — контроль; 2 — 17 НМ; 3 — 65 НМ; 4 — 67 НМ.

стрессового варианта опыта. Сумма Хл *a* и *b* у инокулированных растений была выше соответствующего значения необработанных контрольных стрессовых растений на 25–33% (табл. 2).

Табл. 2. Содержание пигментов (мг/г сырой массы) в листьях растений ($P \leq 0.05$)

Вариант		Хлорофилл <i>a</i>	Хлорофилл <i>b</i>	Хлорофилл <i>a</i> + хлорофилл <i>b</i>
Нормальные условия	Контроль	0.54±0.018	0.14±0.010	0.68±0.020
	<i>Pseudomonas</i> sp. 17 НМ	0.58±0.019	0.16±0.013	0.74±0.021
	<i>Pseudomonas</i> sp. 65 НМ	0.59±0.017	0.17±0.011	0.76±0.022
	<i>Pseudomonas</i> sp. 67 НМ	0.57±0.016	0.16±0.012	0.73±0.020
0.5 мМ Cd ²⁺	Контроль	0.26±0.015	0.10±0.009	0.36±0.014
	<i>Pseudomonas</i> sp. 17	0.35±0.017	0.13±0.011	0.47±0.015
	<i>Pseudomonas</i> sp. 65 НМ	0.36±0.016	0.12±0.012	0.48±0.017
	<i>Pseudomonas</i> sp. 67 НМ	0.34±0.019	0.11±0.009	0.45±0.019

Одним из важнейших процессов, обеспечивающим накопление сухой биомассы и в целом продуктивность растений является фотосинтез. Пигментный состав считается основным индикатором, характеризующим работу фотосинтетического аппарата (Khanna *et al.*, 2019; Maslennikova *et al.*, 2022). Обработка семян люцерны штаммами *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ и 67 НМ увеличивала содержание Хл *a* и Хл *b* в проростках, что свидетельствовало о повышении интенсивности фотосинтеза в листьях инокулированных растений (табл. 2).

Бактериальная обработка семян увеличивала сухую биомассу растений в присутствии Cd относительно неинокулированного контроля (рис. 6б). В эксперименте Cd привел к истощению Хл *a* и Хл *b*, а также к двукратному снижению суммы хлорофиллов в стрессированных растениях относительно нормальных условий роста. Предобработка штаммами псевдомонад влияла на содержание пигментов в листьях проростков в условиях кадмиевого стресса.

Результаты нашего исследования согласуются с данными работ, в которых показана способность устойчивых к ТМ PGPR штаммов бактерий снижать влияние стресса, вызванного загрязнением ТМ у люцерны посевной. Так, обработка растений люцерны, выросших в почве, загрязненной Cd, почвенными бактериями *Sinorhizobium meliloti*, устойчивыми к ТМ, способствовала увеличению накопления растительной биомассы и улучшению усвоения питательных веществ по сравнению с неинокулированными растениями (Ghnaa *et al.*, 2015). Сообщалось, что ИУК продуцирующие штаммы *Bacillus filamentosus* и *Bacillus cereus* стимулировали рост корней и побегов у проростков люцерны, в условиях загрязнения среды Zn и Pb, что снижало токсическое действие данных ТМ на растения (Jócsák *et al.*, 2022).

штамма псевдомонад *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ и 67 НМ. Исследование показало, что штаммы обладают различным уровнем резистентности к ТМ. Для штаммов *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ и 67 НМ, значения МТК составили, соответственно; Cd – 1, 1.5, 1 мМ, Pb – 5, 5, 4 мМ, Ni – 7, 9, 7 мМ, Zn – 1 мМ. Для всех штаммов показано наличие фосфатмобилизующей активности и способность к синтезу ИУК и сидерофоров. Предпосевная обработка семян люцерны данными штаммами псевдомонад приводила к увеличению значений сухой биомассы и фотосинтетических пигментов проростков как в нормальных условиях, так и в присутствии Cd. Данный факт демонстрирует наличие ростстимулирующего и защитного эффектов исследуемых бактерий на растения люцерны в условиях кадмиевого загрязнения на начальном этапе роста. Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что описанные PGPR штаммы псевдомонад могут обладать перспективой применения в качестве биоудобрения в нормальных условиях и для повышения устойчивости к стрессу люцерны посевной, вызванного загрязнением Cd. При этом необходимы вегетационные и полевые эксперименты для оценки полного потенциала данных штаммов в снижении токсического действия ТМ на растения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена в рамках госзадания (тема № 122041400162-3) с привлечением приборного парка ЦКП “Биомика” (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП “Агидель”) и УНУ “КОДИНК”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе из загрязненных почв были выделены и идентифицированы три новых

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баймиев Ан.Х., Ямиданов Р.С., Матниязов Р.Т., Благова Д.К., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Получение флуоресцентно меченных штаммов клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых для их детекции *in vivo* и *in vitro* // Мол. биология. 2011. № 6. С. 984–991.
- Хакимова Л.Р., Чубукова О.В., Мурысова А.Р., Симороз Е.В., Чумакова А.К., Вершинина З.Р. Влияние *Pseudomonas* spp. на растения люцерны *Medicago sativa* при ингибирующем действии солей кадмия // Таврический вестник аграрной науки. 2022. № 2. С. 155–163.
- Чубукова О.В., Хакимова Л.Р., Акимова Е.С., Вершинина З.Р. Филотения и свойства новых штаммов *Pseudomonas* sp. из ризосферы бобовых растений Южного Урала // Микробиология. 2022. № 5. С. 537–546.
- Akinbowale O.L., Peng H., Grant P., Barton M.D. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia // Int. J. Antimicrob. Agents. 2007. V. 30. P. 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.03.012>
- Berendsen R.L., van Verk M.C., Stringlis I.A., Zamioudis C., Tommassen J., Pieterse C.M., Bakker P.A. Unearthing the genomes of plant-beneficial *Pseudomonas* model strains WCS358, WCS374 and WCS417 // BMC Genomics. 2015. V. 16. P. 539. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1632-z>.
- Chen B., Luo S., Wu Y., Ye J., Wang Q., Xu X., Pan F., Khan K.Y., Feng Y., Yang X. The effects of the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* Sasm05 and IAA on the plant growth and cadmium uptake of *Sedum alfredii* Hance // Front Microbiol. 2017. V. 8. P. 2538. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02538>
- Choudhury S., Chatterjee A. Microbial application in remediation of heavy metals: an overview // Arch. Microbiol. 2022. V. 204. P. 268. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02874-1>
- Desoky E.S.M., Merwad A.R. M., Semida W.M., Ibrahim S.A., El-Saadony M. T., Rady M.M. Heavy metals-resistant bacteria (HM-RB): Potential bioremediators of heavy metals-stressed *Spinacia oleracea* plant // Ecotoxicol. Environ. Saf. // 2020. V. 198. P. 110685. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110685>
- Ghnaya T., Mnassri M., Ghabriche R., Wali M., Poschenrieder C., Lutts S., Abdelly C. Nodulation by *Sinorhizobium meliloti* originated from a mining soil alleviates Cd toxicity and increases Cd-phytoextraction in *Medicago sativa* L. // Front. Plant 2015. V. 6. P. 863. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.0086>
- Girard L., Lood C., Rokni-Zadh H., van Noort V., Lavigne R., De Mot R. Reliable identification of environmental *Pseudomonas* isolates using the *rpoD* gene // Microorganisms. 2020. V. 8. P. 1166. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081166>
- Gu Y., Ma Y.N., Wang J., Xia Z., Wei H.L. Genomic insights into a plant growth-promoting *Pseudomonas koreensis* strain with cyclic lipopeptide-mediated antifungal activity // Microbiology. 2020. V. 9. e1092. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1092>
- Jócsák I., Knolmayer B., Szarvas M., Rabnecz G., Pál-Fám F. Literature review on the effects of heavy metal stress and alleviating possibilities through exogenously applied agents in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) // Plants (Basel). 2022. V.11. P. 2161. <https://doi.org/10.3390/plants11162161>
- Khakimova L., Chubukova O., Vershinina Z., Maslennikova D. Effects of *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1 on growth and tolerance to cadmium stress in *Pisum sativum* L. // BioTech (Basel). 2023. V. 12. P. 5. <https://doi.org/10.3390/biotech12010005>.
- Kaminski M.A., Furmanczyk E.M., Sobczak A., Dziembowski A., Lipinski L. *Pseudomonas silesiensis* sp. nov. strain A3^T isolated from a biological pesticide sewage treatment plant and analysis of the complete genome sequence // Syst. Appl. Microbiol. 2018. V. 41. P. 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.09.002>
- Khanna K., Jamwal V.L., Gandhi S.G., Ohri P., Bhardwaj R. Metal resistant PGPR lowered Cd uptake and expression of metal transporter genes with improved growth and photosynthetic pigments in *Lycopersicon esculentum* under metal toxicity // Scientific reports. 2019. V. 9. 5855. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41899-3>
- Lalucat J., Mulet M., Gomila M., García-Valdés E. Genomics in bacterial taxonomy: impact on the genus *Pseudomonas* // Genes (Basel). 2020. V. 11. P. 139. <https://doi.org/10.3390/genes11020139>
- Li D., Xu X., Yu H., Han X. Characterization of Pb²⁺ biosorption by psychrotrophic strain *Pseudomonas* sp. I3 isolated from permafrost soil of Mohe wetland in Northeast China // J. Environ. Manage. 2017. V. 196. P. 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.02.076>
- Maslennikova D., Nasyrova K., Chubukova O., Akimova E., Baymiev A., Blagova D., Ibragimov A., Lastochkina O. Effects of *Rhizobium leguminosarum* Thy2 on the growth and tolerance to cadmium stress of wheat plants // Life (Basel). 2022. V. 12. P. 1675. <https://doi.org/10.3390/life12101675>
- Mtengai K., Ramasamy S., Msimuko P., Mzula A., Mwega E.D. Existence of a novel heavy metal-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain Zambia SZK-17 Kabwe 1: the potential bioremediation agent in the heavy metal-contaminated area // Environ. Monit. Assess. 2022. V. 194. P. 887. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10565-z>
- Mulet M., Bennasar A., Lalucat J., Garcia-Valdes E. An *rpoD*-based PCR procedure for the identification

- of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples // Mol. Cell Probes. 2009. V. 23. P. 140–147.
<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2009.02.001>
- Mulet M., Lalucat J., García-Valdés E. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species // Environ. Microbiol. 2010. V. 12. P. 1513–1530.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x>
- Manzoor M., Abid R., Rathinasabapathi B., De Oliveira L.M., da Silva E., Deng F., Rensing C., Arshad M., Gul I., Xian P., Ma L.Q. Metal tolerance of arsenic-resistant bacteria and their ability to promote plant growth of *Pteris vittata* in Pb-contaminated soil // Sci Total Environ. 2019. V. 660. P. 18–24.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.013>
- Narancic T., Salvador, M., Hughes, G. M., Beagan, N., Abdulmutalib, U., Kenny, S. T., Jimenez, J. I. Genome analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas umsongensis* GO16: the genetic basis for PET monomer upcycling into polyhydroxyalkanoates // Microb. Biotechnol. 2021. V. 14. P. 2463–2480.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13712>
- Pande V., Pandey S.C., Sati D., Bhatt P., Samant M. Microbial interventions in bioremediation of heavy metal contaminants in agroecosystem // Front. Microbiol. 2022. V. 6. P. 824084.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.824084>
- Patel J.S., Patel P.C., Kalra K. Isolation and characterization of nickel uptake by nickel resistant bacterial isolate (NiR-BI) // Biomed. Environ. Sci. 2006. V. 19 P. 297–301.
- Raklami A., Meddich A., Oufdou K., Baslam M. Plants-microorganisms-based bioremediation for heavy metal cleanup: recent developments, phytoremediation techniques, regulation mechanisms, and molecular responses // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 5031.
<https://doi.org/10.3390/ijms23095031>
- Saif S., Khan M.S. Assessment of heavy metals toxicity on plant growth promoting rhizobacteria and seedling characteristics of *Pseudomonas putida* SFB3 inoculated greengram // Acta Scientific Agriculture. 2017. V. 1. P. 47–56.
- Singh P., Singh R.K., Zhou Y., Wang J., Jiang Y., Shen N., Jiang M. Unlocking the strength of plant growth promoting *Pseudomonas* in improving crop productivity in normal and challenging environments: a review // J. Plant Interac. 2022. V. 17. P. 220–238.
<https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2029963>
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.
- Wang Y., Narayanan M., Shi X., Chen X., Li Z., Natarajan D., Ma Y. Plant growth-promoting bacteria in metal-contaminated soil: Current perspectives on remediation mechanisms // Front. Microbiol. 2022. V. 13. P. 966226.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.966226>

Heavy metals-resistant PGPR strains of *Pseudomonas* sp. stimulating the growth of alfalfa under cadmium stress

O. V. Chubukova^{1, #}, L. R. Khakimova¹, R. T. Matnyazov¹, Z. R. Vershinina^{1, 2}

¹Institute of Biochemistry and Genetics—Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
 of the Russian Academy of Sciences, st. Prospect Oktyabrya, 71, Ufa, 450054 Russia

²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Ufa State Petroleum Technological University”,
 st. Kosmonavtov, 1, Ufa, 450000 Russia

[#]E-mail: chubukova@bk.ru

Three bacteria strains of *Pseudomonas* sp. resistant to heavy metals were isolated from the chemically contaminated soil. According to the results on the nucleotide sequences of the 16S rRNA and *rpoD* genes, strain *Pseudomonas* sp. 17 HM was identified as *Pseudomonas capeferrum*, and the strains of *Pseudomonas* sp. 65 HM и 67 HM were most closely related to the type strain of *Pseudomonas silesiensis* и *Pseudomonas umsongensis*, respectively. It has been shown that strains of *Pseudomonas* sp. 17 HM, 65 HM, 67 HM are characterized by different levels of resistance of heavy metals: maximum tolerance concentration (MTC) of zinc was 1 mM for all strains, cadmium 1, 1.5, 1 mM, lead 5, 5, 4 mM, nickel 7, 9, 7 mM, respectively. All pseudomonad strains can form biofilms and have the properties of PGPR bacteria. Treatment of alfalfa seeds (*Medicago sativa* L.) with strains *Pseudomonas* sp. 17 HM, 65 HM, 67 HM under cadmium stress led to an increase in the dry weight of alfalfa seedling up to 40 % and the content of chlorophyll *a* and *b* in the leaves by 25–33% relative to the control.

Key words: PGPR strains, *Pseudomonas* sp., 16S rRNA gene, *rpoD* gene, cadmium stress, maximum tolerant concentration, heavy metals

УДК 577.218

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГОМЕОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИСТЬЯХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ГИПОКСИИ

© 2024 г. Д. Н. Федорин, А. Т. Епринцев[®]

ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1, г. Воронеж, 394018 Россия

[®]E-mail: bc366@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 06.10.2023 г.

После доработки 27.12.2023 г.

Принята к публикации 27.12.2023 г.

Установлено увеличение активности ГДГ при воздействии на растения гипоксических условий в первые 6 часов, что обеспечивает формирование адаптивной реакции клеточного метаболизма к недостатку кислорода в клетке. Показано различие в транскрипционной активности гомеологичных генов *GDH-1* в листьях пшеницы в стрессовых условиях. Увеличение содержания мРНК гена *GDH-1(5A)* в листьях пшеницы при воздействии на растения гипоксических условий наблюдается в первые часы эксперимента, что соотносится с изменением каталитической активности глутаматдегидрогеназы. Регуляция данного гена осуществляется транскрипционным фактором HIF, специфический сайт посадки которого обнаружен в зоне инициации транскрипции промотора данного гена.

Ключевые слова: глутаматдегидрогеназа, пшеница, гипоксия, регуляция, ген, экспрессия, промотор

DOI: 10.31857/S1026347024050048, **EDN:** ulrckh

Растения способны переносить недостаток кислорода, который возможен, в том числе, и в естественных условиях, например, при затоплении почв, в горах и других специфических условиях (Vartapetian, Jackson, 1997; Войцекоская и др., 2010). При этом разные виды организмов по-разному реагируют на неспецифические условия, и ответная реакция проявляется не только на уровне целого организма, но и отдельные органы в определенной зависимости реагируют на недостаток кислорода в окружающей среде.

Важное значение в реакции растительной клетки на гипоксический стресс играют биохимические и молекулярные механизмы, которым в последнее время уделяется особое внимание. Исследуются механизмы контроля транскрипционной активности генов энзимов, обеспеченной действием различных специализированных факторов транскрипции (Wenger *et al.*, 2005). Данный контроль актуален в отношении ферментов окислительного и конструктивного метаболизма растительной клетки.

Глутаматдегидрогеназа (ГДГ, L-глутамат: НАД(Ф)-оксидоредуктаза, КФ 1.4.1.2), катализируя реакцию восстановительного аминирования 2-оксоглутарата до L-глутамата (или обратную реакцию окислительного дезаминирования глутамата до 2-оксоглутаровой кислоты) принимает участие

в углеродном и азотном обмене, что связано с тем, что обусловлено важным значением глутамата в метаболизме аминокислот в организмах разного уровня организации (Dubois, *et al.*, 2003). Аммонийная группа глутамата является источником при переаминировании с образованием других аминокислот, кроме того, глутамат представляет собой субстрат для биосинтеза γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), аргинина, пролина и хлорофиллов (Forde, Lea, 2007; Shelp *et al.*, 2012).

Помимо этого, ГДГ является первым этапом ответвления дыхательного метаболического пути в сторону ГАМК-шунта (Bown, Shelp., 1997). 2-оксоглутарат является непосредственным субстратом катализируемой ГДГ реакции, из которого формируется глутамат, направляемый в дальнейшем на синтез ГАМК с помощью глутаматдекарбоксилазы (КФ 4.1.1.15) (Fait *et al.*, 2008).

Регуляция активности глутаматдегидрогеназы на уровне экспрессии ее генов представляет собой механизм координации метаболизма глутамата в стрессовых условиях. Нативный белок ГДГ состоит из субъединиц α и β , каждая из которых детерминирована своим геном, которые объединяются в разных соотношениях с образованием гексамера, и эти комбинации создают разные изоферменты (Grabowska *et al.*, 2012). Актуальным представляется исследование механизмов

регуляции экспрессии генов ГДГ в листьях пшеницы в ответ на стрессовое воздействие гипоксии.

Цель работы — изучение регуляции транскрипционной активности гомеологичных генов глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы при адаптивной реакции клеточного метаболизма к гипоксии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали листья пшеницы (*Triticum aestivum* L.), выращенные гидропонным способом при 12-часовом световом дне с интенсивностью света 90 мкмоль квантов света $\cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, при температурном оптимуме 25°C.

Выявление гомологии исследуемых нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью Clustal Omega (Sievers, Higgins, 2014).

Гипоксические условия создавали на основе ранее разработанной методики, позволяющей получить содержание кислорода менее $\leq 0.5\%$ (Igamberdiev, Hill, 2008).

Митохондриальную фракцию получали методом дифференциального центрифугирования со средой выделения следующего состава: 50 мМ Трис-HCl буфера, pH 7.5, содержащий 0.3 М сахарозу, 2.5 мМ ЭДТА, 1 мМ KCl и 4 мМ MgCl_2 . Осадок, содержащий в основном митохондрии и микротельца, ресуспендировали в 1 мл среды выделения без сахарозы и использовали для определения активности ГДГ спектрофотометрическим методом при 340 нм в среде, содержащей 13 мМ 2-оксоглутарат, 0.25 мМ НАДН, 1 мМ CaCl_2 , 50 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100 мМ HEPES буфер pH 8.0 (Sarasketa *et al.*, 2016). Реакцию инициировали добавлением фермента. Контролем при определении активности ГДГ являлась среда спектрофотометрирования без субстрата (2-оксоглутарата), но содержащая белковый экстракт митохондрий.

Оценку степени загрязнения митохондриальной фракции проводили на основе анализа активности лактатдегидрогеназы — цитоплазматического фермента при 340 нм. Среда спектрофотометрирования была следующего состава: 0.05 М калий-фосфатный буфер (pH 7.5), 3 мМ пирувата натрия, 9 мМ НАДН (Епринцев и др., 2022).

РНК выделяли при помощи фенол-хлороформной экстракции с добавлением гуанидинтиоционата (Chomczynski, Sacchi, 1987).

Комплементарную ДНК получали методом обратной транскрипции с помощью коммерческого набора MMLV-R (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя.

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили на приборе LightCycler 96 (Roche, США), применяя в качестве красителя SYBR Green I. В качестве матрицы использовали

кДНК, полученную из 100 нг суммарной клеточной РНК. Амплификация гена фактора элонгации *EF-1 α* осуществлялась для контроля матрицы (Nicot *et al.*, 2005).

Опыты проводили в трех биологических и четырех аналитических повторностях. Данные были подвергнуты двустороннему дисперсионному анализу (ANOVA) с использованием программного обеспечения для анализа данных STATISTICA версии 9 (Statsoft Wipro, East Brunswick, NJ, USA). Результаты представлены в виде средних значений и стандартных отклонений (SD). Обсуждаются статистически значимые различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследований влияния гипоксии на активность митохондриальной формы глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы проводились с учетом загрязнения фракции митохондрий цитоплазматической фракцией. Величина каталитической активности лактатдегидрогеназы в цитоплазме клеток листьев контрольных растений составляла 0.41 ± 0.017 Е/г сырой массы, в то время как в митохондриальной фракции данный показатель равнялся 0.043 ± 0.005 Е/г сырой массы. Выявленная степень загрязнения митохондриальной фракции составила 10.4% соответственно, что учитывалось при определении активности глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы при разных условиях эксперимента.

Проведенное исследование по влиянию низких концентраций кислорода на функционирование ГДГ показало, что в первые часы инкубации растений в среде с низким содержанием кислорода и азотом в качестве преобладающего газа наблюдалось увеличение скорости функционирования исследуемого фермента по реакции аминирования. В первый час экспозиции в условиях азотной

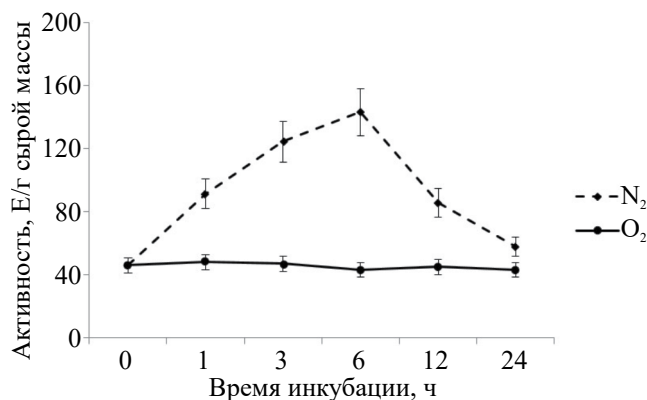


Рис. 1. Активность глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы в условиях гипоксии.

Таблица 1. Субгеном-специфичные праймеры для глутаматдегидрогеназы *Triticum aestivum*

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность
<i>GDH-1(5A)</i>	Прямой	GTAATGTTGGCTCCTGGGCT
	Обратный	CGCAGCCTCGATGATGTACT
<i>GDH-1(5B)</i>	Прямой	CCCGTCGAAGTCACAACTCA
	Обратный	GTTTCACTCTCAGCCACGGA
<i>GDH-1(5D)</i>	Прямой	GAGTGGGTGCAGAACATCCA
	Обратный	CAGCATCTGTCAACGCACAC

среды увеличение каталитической активности ГДГ составило 1.89 раза относительно контрольных значений, характерных для растений, экспонируемых в нормальных условиях (рис. 1).

Дальнейшее пребывание растений в условиях среды азота также приводило к постепенному увеличению скорости функционирования глутаматдегидрогеназы вплоть до 6 часа, где анализируемый показатель достигал максимального значения 143.2 Е/г сырой массы. Однако стоит отметить, что после 6 часа пребывания растений пшеницы в среде азота происходило постепенное снижение величины активности ГДГ, и данный показатель в 24 часа составил 57.8 Е/г сырой массы.

Группа контрольных растений не демонстрировала значительных изменений общей ферментативной активности.

Для пшеницы установлено, что глутаматдегидрогеназа кодируется набором гомеологичных генов, расположенных на разных хромосомах. Ген *GDH-1* представлен аллелями в гомеологичных хромосомах: *GDH-1(5A)* (LOC123105375), расположен в 5А хромосоме и включает в свой состав 9 экзонов, *GDH-1(5B)* (LOC123113648), который локализован в 5В хромосоме и включает 9 экзонов, *GDH-1(5D)* (LOC123123357), который локализован в 5В хромосоме и включает 6 экзонов. Последовательности матричной РНК генов ГДГ *Triticum aestivum* были взяты из международной базы данных NCBI, на основании которых были разработаны специфические праймеры (табл. 1).

Относительный уровень транскриптов генов гомеологов глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы является неодинаковой. Наибольшая активность характерна для гена *GDH-1(5A)* (рис. 2). Относительный уровень транскриптов гена *GDH-1(5B)* на 56% ниже такового показателя для гена *GDH-1(5A)*, но наименьший уровень экспрессии характерен для гена *GDH-1(5D)*.

Показано, что гипоксия влияет на регуляцию экспрессии генов исследуемой ферментной системы. После первого часа инкубации в среде азота не наблюдалось достоверно значимых изменений в содержании мРНК гена *GDH-1(5A)* в листьях

пшеницы (рис. 3). Однако в последующие часы экспозиции растений в среде азота было установлено увеличение анализируемого показателя относительно контроля и максимальное содержание транскриптов гена глутаматдегидрогеназы обнаружено на 6 час экспозиции. Исследуемый показатель составлял на 6 час эксперимента 1.78 ед., что свидетельствует об активации транскрипции исследуемого гена. После шестого часа эксперимента

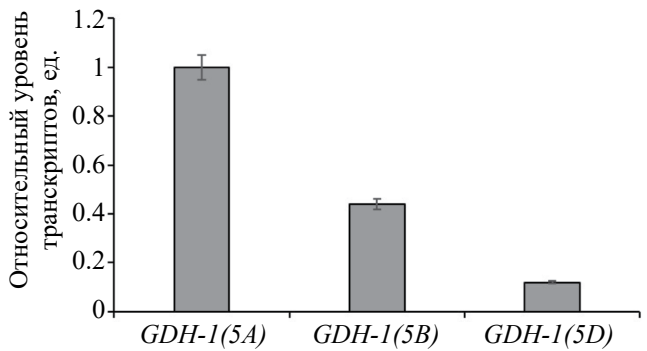


Рис. 2. Относительный уровень транскриптов гомеологичных генов *GDH-1(5A)*, *GDH-1(5B)* и *GDH-1(5D)* глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы.

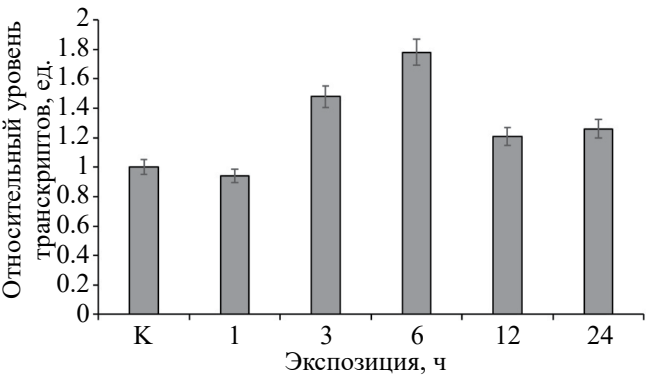


Рис. 3. Относительный уровень транскриптов гена *GDH-1(5A)* в листьях пшеницы в условиях гипоксии.

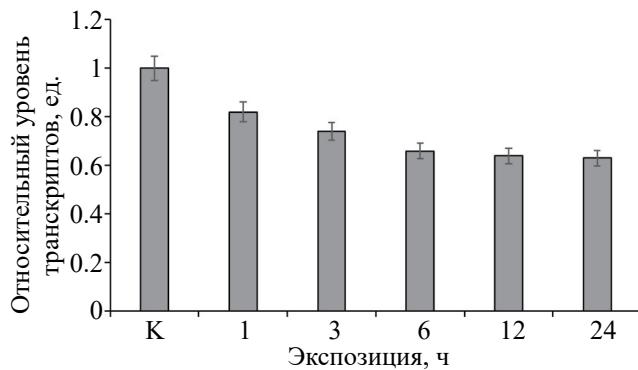


Рис. 4. Относительный уровень транскриптов гена *GDH-1(5B)* в листьях пшеницы в условиях гипоксии.

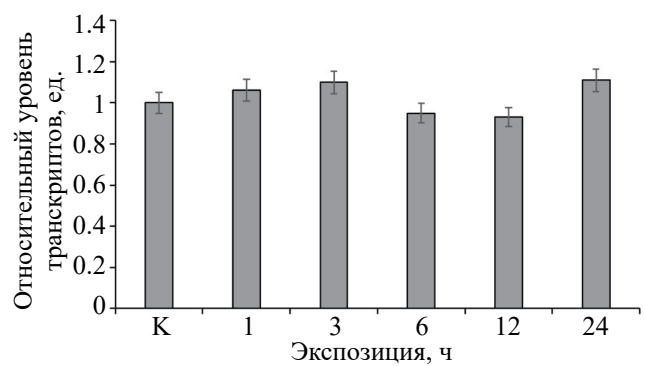


Рис. 5. Относительный уровень транскриптов гена *GDH-1(5D)* в листьях пшеницы в условиях гипоксии.

наблюдалось постепенное снижение относительного уровня транскриптов гена *GDH-1(5A)* в листьях пшеницы.

Исследование относительного уровня транскриптов гена *GDH-1(5B)* глутаматдегидрогеназы в условиях недостатка кислорода показало уменьшение исследуемого показателя уже на первый час эксперимента. Снижение транскрипционной активности составило 18% относительно такового показателя в норме. Такое изменение экспрессии гена, кодирующего глутаматдегидрогеназу, подтверждает различие в ответной реакции транскрипционной активности генома пшеницы в ответ на действие гипоксического

стресса при регуляции гомеологических генов. С 6 часа инкубации относительный уровень транскриптов исследуемого гена постепенно снижается, достигая минимальных значений (рис. 4). В условиях низкого содержания кислорода в среде снижение транскрипционной активности гена *GDH-1(5B)* к 24 часу эксперимента составило в 1.58 раз.

Незначительное уменьшение транскрипционной активности гена *GDH-1(5D)* наблюдалось на 6 и 12 часы эксперимента (рис. 5), когда уменьшение содержания его мРНК в листьях пшеницы при солевом стрессе на 6 и 12 час экспозиции составило 5–7% от контрольных значений.

ATACCGAGTAAAATGAGTGAATCTACGCTCTAAAACATGTCTATATAC
 ATTTATATGTAGTCTCTCTTAAAAACCAATATCTAAAAAGCCTTATATTT
 AGAAACGGAGGGAGCAGTACTTGACTGTTGACGGACATGTATTGTGAG
 CATGAAGTGTCAGGAATC**ACGTGTTACACGTG**CATGCATGCTCATCACC
 GTCAGCGTATCAGCAAATTGCCTGGCGCAAGCTGTGCAGCCGGTACAT
 CCACAGCTCAGTACATACATTGATACATACGTACATAGCACACCTAACCC
 GATTTGAGCAGTAATCTGAAGTTGCCACATGCAGAGGGCTTCCTTGAACA
 CTCACCTCCACTGACTTGTGGCTCAAATTCTGGGCATTTTCTCAGCAAA
 ACAAGCGCAGCTGTCGGCAGTCTGGATCTTCATTGATGTTGGCCCTA
 GAACAGTGATCATTTTGTAGTAGATGTTAGTAAGCTCCTAGCCCGGAAC
 TACTGAGCAGCGCTCCTCCTAGCCTAGCACCTCTTCTAAACTAAACAAA
 AGGGGAGGTGGTGCATTCTTGGCATAGATTGATGCTCTTCAATCTGGT
 ACTGGTAGGCTAGGAGTAGTAGTAAATTACGGTATTGAGTGAGTGCAGA
 CAGGGCTCGGGTCTCGAGGGAAATTAATTGCAGGCAGGGCGAGAATCA
 GATCTTGTCTTATCCTTGATAGAGACAAAAAAATTAATTTAAAG
 AAAAATCTCCTCTGCTTTTGAACGGAACCCAAATCCACCGAGGGGTTTC
 AGCCAGTGTCCTATATATGCATACGGCCTACCTGAAACTCCTCCATA
 GTCTTTGTGCCGCTGCTCGCCACTAACACTTCGCGGCTACTCCACTCGC
 CGGTAATATAAAGCAGATTATCCTTTGGTTCTCGCGCAGAGTTTAAT
 CTTTTTGTCTCGTGTGATTAGTGTTCTTGGATTGCTACCTATGATGTTGG
 GTTTCTGGATCCGTTTTTCAGGCGCGGGCGGCTCCGGAGGGGGGATTTTCG
 TCGGGCAGG**ATG**

Рис. 6. Последовательность промотора гена *GDH-1(5A)* с обозначением специфического сайта посадки транскрипционного фактора ответа HIF-1 (фактор ответа на гипоксию) (выделено серым). Стартовый кодон ATG выделен подчеркиванием.

Исследование нуклеотидных последовательностей промоторов гомеологичных генов глутаматдегидрогеназы пшеницы на предмет наличия в их составе специфических сайтов связывания с индуцируемым гипоксией фактором (HIF) (рис. 6), обуславливающим стресс-зависимый контроль активности генов-мишеней при недостатке кислорода, показало наличие таковых элементов в составе нуклеотидной последовательности промотора гена *GDH-1(5A)*.

Однако существует набор транскрипционных факторов, осуществляющих отрицательную регуляцию экспрессии генов-мишеней в условиях гипоксии при наличии в составе их промоторов специфического сайта — W-box (Turchi *et al.*, 2015).

Анализ нуклеотидных последовательностей промоторов генов гомеологов глутаматдегидрогеназы пшеницы позволил установить различие в содержании регуляторных *cis*-элементов, в частности W-box. Показано, что из трех гомеологичных генов *GDH-1(5A)*, *GDH-1(5B)* и *GDH-1(5D)* в составе нуклеотидной последовательности промотора W-box присутствует только в составе промотора гена *GDH-1(5B)* (рис. 7). Важно отметить, что располагается он от –103 до –96 положению, что играет ключевое значение его участия в отрицательной регуляции экспрессии данного гена-мишени, при гипоксическом стрессе (Seok *et al.*, 2022).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Глутаматдегидрогеназа катализирует обратимую реакцию аминирования/дезаминирования, которая может привести либо к синтезу, либо к катаболизму глутамата. Недавние исследования подтвердили, что как в молодых, так и в старых листьях табака глутамат синтезируется за счет комбинированного действия глутаминсинтазы и глутаматсинтазы, в то время как глутаматдегидрогеназа отвечает за деаминацию глутамата (Terce-Laforge, *et al.*, 2004, Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006). Альфа-аминогруппа

глутамата также может быть перенесена в пируват с образованием аланина под действием аланинаминотрансферазы (КФ 2.6.1.2). Было показано, что синтез аланина играет ключевую роль в ответе на гипоксию/аноксию (Ricoult *et al.*, 2006).

Ряд генов метаболизма азота сверхэкспрессируется при низком содержании кислорода, например, глутаматдегидрогеназа, глутаматдекарбоксилаза и глутаматсинтаза. Было показано, что они индуцируются на ранних стадиях стресса (0.5–6 ч) [1] и подавлялись, когда стресс длился более 20 часов (Klok *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2011).

Изменения ферментативной активности в стрессовых условиях может быть связано как с посттрансляционной конформацией белков, так и с изменением транскрипционной активности генов исследуемых ферментов.

Полиплоидия, и особенно аллополиплоидия, часто приводит к тому, что один субгеном становится доминирующим над другими, что проявляется в асимметрии экспрессии генов. В основе доминирования лежат различная степень метилирования субгеномов, модификации гистонов и плотность мобильных генетических элементов (Feldman *et al.*, 2012, Bird *et al.*, 2018). Около 30% триад генов-гомеологов пшеницы (включающих копии генов в А, В и D субгеномах) демонстрируют несбалансированные уровни экспрессии, с более высокой или более низкой экспрессией одного гомеолога по сравнению с двумя другими (Ramirez-Gonzalez *et al.*, 2018).

Нами разработаны субгеном-специфичные праймеры для трех гомеологичных генов ГДГ у аллогексаплоидной пшеницы, позволяющие изучить экспрессию данных генов и провести оценку вклада каждого гомеолога фермента в организации метаболизма клетки пшеницы в условиях гипоксии. Полученные результаты анализа уровня транскриптов генов глутаматдегидрогеназы свидетельствуют, что наибольший вклад в формировании белкового компонента исследуемого фермента вносит ген *GDH-1(5A)*. Исследование уровня транскриптов

```
CCGCGCCACCGTCTCCGCGGCTGGGAGGCCTGATCGCTCGCCGGCCG
GCATCCTGCAATGCCCGTGCTCTCTCGCCGACTCCATGGGATCCCGTCTG
AAGTCACAACCAACAAAAAGTTCAATAATCGAGCCCGTGCGTTCTCTCT
ATACATAAGCTCCGATCTCTTGGAGAGACCGGCAGAACAGTAGCGGCA
CCACCTTCTTCTTGTAATCCGTGGCTGAGAGTGAAACACAGCAATGATA
TTCGGTTTCTTTCTTGGTAACATTTGATCGTGTTTATGATGCGTGAGTC
GCTTTTATTAGCATCGCATGGCAACAAGCCGGCCAACAAGGTCATG
```

Рис. 7. Последовательность промотора гена *Gdh-1(5B)* с обозначением специфического *cis*-элемента (выделено серым с зачеркиванием) отрицательной регуляции экспрессии при гипоксии. Стартовый кодон ATG выделен подчеркиванием.

гена глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы в среде с азотом показало определенную зависимость. Результаты исследования свидетельствуют о зависимости уровня транскриптов гена глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы от кислородного режима растений. Снижение содержания кислорода в среде инкубации растений приводит к увеличению содержания мРНК гена *GDH-1(5A)*, что коррелирует с активацией исследуемого фермента. Проведенное исследование динамики относительного уровня транскриптов гомеологического гена *GDH-1(5D)*, кодирующего глутаматдегидрогеназу пшеницы, показало минимальное отклонение величины его экспрессии относительно контрольных значений при гипоксии.

Индуклируемый гипоксией фактор (HIF) — фактор транскрипции имеет решающее значение для регуляции генов-мишеней в ответ на гипоксию. Индуцируемым гипоксией фактор 1 (HIF-1) представляет собой димер HIF-1 α и ARNT (HIF-1 β), который связывается с элементами ответа на гипоксию (HRE), расположенными в регуляторной области чувствительных генов, тем самым стимулируя их транскрипцию. Основная последовательность сайта связывания HIF-1 (5'-A/GCGTG-3') соотносится с последовательностью HRE (5'-CACG(T/C)-3'), обеспечивающих контроль экспрессии гипоксически-зависимых генов (Wenger *et al.*, 2005; Xia, Kungr 2009). Наличие двух специфических сайтов HIF-1 в составе промотора гена *GDH-1(5A)* способствует изменению экспрессии данного гена в условиях гипоксии, что проявляется в увеличении его мРНК в клетках листьев пшеницы. При этом отсутствие сайтов связывания HIF-1 в промоторах двух других гомеологических генов соотносится с отсутствием их активации при недостатке кислорода.

Кроме того, исследование нуклеотидных последовательностей промоторов генов ГДГ пшеницы показало наличие в составе *GDH-1(5B)* отрицательного цис-регуляторного элемента на гипоксию (5'-AATGATA-3', W-box) (Turchi *et al.*, 2015) в области инициации транскрипции. Важное значение в осуществлении данного типа регуляции играет именно положение W-box на нуклеотидной последовательности промотора, в частности, для осуществления регуляции он должен находиться в положении от -116 до -2 в промоторе (Seok *et al.*, 2022).

Исследование нуклеотидной последовательности промотора гена *GDH-1(5D)* на наличие в его составе *cis*-элементов отрицательной и положительной регуляции показало их отсутствие. Стабильный уровень его экспрессии в листьях пшеницы при гипоксическом стрессе обусловлен отсутствием взаимодействия с ним гипоксически-зависимых транскрипционных факторов с соответствующими регуляторными *cis*-элементами.

Проведенные исследования регуляции функционирования глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы при гипоксическом стрессе свидетельствуют о четкой реакции клеточного метаболизма на недостаток кислорода. Установлено, что в условиях гипоксического стресса активируется ГДГ, как компонент ГАМК-шунта, что подтверждают полученные данные по изменению каталитической активности данного фермента, так и изменение транскрипционной активности генов. Особое значение в активации ГДГ при гипоксии играет ген *GDH-1(5A)*, активация которого обеспечивает формирование необходимого количества белковых компонентов ГДГ. Активация ГАМК-шунта обеспечивает образование полуальдегида янтарной кислоты в митохондриальном матриксе, который превращается либо в сукцинат под действием дегидрогеназы полуальдегида янтарной кислоты и поступает в ЦТК для поддержания энергетических потребностей клеточных процессов (Greenway, Gibbs, 2003), либо же в γ -гидроксимасляную кислоту (ГМК) и направляется на биосинтетические процессы или выступает в качестве сигнальной молекулы (Miyashita, Good 2008). Индукция и координация экспрессии генов, реагирующих на гипоксию, находятся под контролем факторов транскрипции, принадлежащих к факторам ответа этилена группы VII (ERFs), RAP2.2, RAP2.3, RAP2.12, HRE1 и HRE2 (Bailey-Serres *et al.*, 2012, Limami *et al.*, 2014, Van Dongen, Licausi, 2015).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы было выявлено влияние недостатка кислорода на функционирование глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы. Установлено изменение ферментативной активности исследуемой ферментной системы в листьях пшеницы в среде азота, что указывает на стресс-индуцированное изменение активности ГДГ.

Гипоксические условия также оказывают значительные изменения в функционировании ГДГ в среде, содержащей азот, и при этом наблюдается увеличение ферментативной активности в первые 6 часов экспозиции, что вызывает вовлечение в адаптивную реакцию клеточного метаболизма глутаматдегидрогеназы. При недостатке кислорода наблюдается значительная активация азотного метаболизма, что требует увеличения синтеза глутамата, как первичной аминокислоты. Данный синтез обеспечивает ГДГ, осуществляя отток 2-оксоглутарата из ЦТК. Альфа-аминогруппа глутамата также может быть перенесена в пируват с образованием аланина под действием аланинаминотрансферазы. Было показано, что синтез аланина играет ключевую роль в ответе на гипоксию. Кроме того, показано изменение содержания транскриптов

гена, кодирующего ГДГ в листьях пшеницы в условиях гипоксии. Увеличение содержания мРНК гена *GDH-1(5A)* в листьях пшеницы при воздействии на растения гипоксических условий наблюдается в первые часы эксперимента, что соотносится с изменением каталитической активности глутаматдегидрогеназы. Полученные результаты по анализу активности ГДГ и уровня экспрессии его гена свидетельствуют о регуляции его функционирования за счет изменения экспрессии генетического материала клетки.

Полученные результаты оценки наличия регуляторных элементов, обеспечивающих контроль гипоксического ответа, в составе нуклеотидных последовательностей промоторов генов гомеологов глутаматдегидрогеназы пшеницы, свидетельствуют о тонком механизме контроля их транскрипционной активности на уровне взаимодействия с соответствующими транскрипционными факторами. Установлено, что активация гена *GDH-1(5A)* в условиях гипоксии обусловлена наличием в составе его промотора положительного регуляторного *cis*-элемента HRE для фактора HIF-1. Данный элемент обнаружен только в составе промотора гена *GDH-1(5A)*, что соотносится с увеличением его транскрипционной активности в условиях гипоксии в листьях пшеницы уже с первого часа эксперимента.

Кроме того, в составе промотора гена *GDH-1(5B)* обнаружен отрицательно регулирующий *cis*-элемент – W-box, который не был обнаружен в составе промоторов других анализируемых в работе генов. Данный *cis*-элемент располагается в инициации транскрипции, что способствует угнетению экспрессии данного гена с первых часов экспозиции растений в условиях недостатка кислорода. Таким образом, установлено, что регуляция работы ГДГ при действии стрессового фактора, такого как гипоксия, осуществляется с помощью регуляции уровня транскриптов гомеологичных генов исследуемого фермента, осуществляемая при участии гипоксически индуцируемых факторов транскрипции.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023–2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Войцекская С.А., Сотникова Н.В., Верхотурова Г.С., Зайцева Т.А., Боровикова Г.В., Астафурова Т.П. Особенности метаболической адаптации у растений амаранта в условиях гипобарической гипоксии // Сельскохозяйственная биология. 2010. № 5. С. 106–111.
- Епринцев А.Т., Бондарева И.Р., Селиванова Н.В. Уровни экспрессии и активность изоферментов лактатдегидрогеназы печени крыс при аллоксановом диабете // Биомедицинская химия. 2022. Т. 68. С. 32–38.
DOI: 10.18097/PBMC20226801032
- Bailey-Serres J., Fukao T., Gibbs D.J., Holdsworth M.J., Lee S.C., Licausi F., Perata P., Voisenek L.A.C.J., van Dongen J.T. Making sense of low oxygen sensing // Trends Plant Sci. 2012. V. 17. P. 129–138.
DOI: 10.1016/j.tplants.2011.12.004.
- Bird K.A., VanBuren R., Puzey J.R., Edger P.P. The causes and consequences of subgenome dominance in hybrids and recent polyploids // New Phytologist. 2018. V. 220. P. 87–93.
DOI: 10.1111/nph.15256.
- Bown A.W., Shelp B.J. The metabolism and functions of g-aminobutyric acid // Plant Physiol. 1997. V. 115. P. 1–5.
DOI: 10.1016/s1360-1385(99)01486-7.
- Chomczynski P., Sacchi N. Singlestep-method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 156–159.
DOI: 10.1006/abio.1987.9999.
- Dubois F., Terce-Laforgue T., Begona G.-M. M., Estavillo J.-M. Glutamate dehydrogenase in plants; is there a new story for an old enzyme? // Plant Physiol. Biochem. 2003. V. 41. P. 565–576.
DOI: 10.1016/S0981-9428(03)00075-5
- Fait A., Fromm H., Walter D., Galili G., Fernie A.R. High way or by way: the metabolic role of the GABA shunt in plants // Trends Plant Sci. 2008. V. 13. P. 14–19.
DOI: 10.1016/j.tplants.2007.10.005.
- Feldman M., Levy A.A., Fahima T., Korol A. Genomic asymmetry in allopolyploid plants: wheat as a model // Journal of experimental botany. 2012. V. 63. P. 5045–5059.
DOI: 10.1093/jxb/ers192.
- Forde B., Lea P. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signaling // Journal of Experimental Botany. 2007. V. 58. P. 2339–2358.
DOI: 10.1093/jxb/erm121.

- Grabowska A., Kwinta J., Bielawski W.* Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in triticale seeds: molecular cloning and genes expression // *Acta Physiologiae Plantarum*. 2012. V. 34. P. 2393–2406.
DOI: 10.1007/s11738-012-1085-9
- Greenway H., Gibbs J.* Mechanisms of anoxia tolerance in plants. II. Energy requirements for maintainance and energy distribution to essential processes // *Funct. Plant Biol.* 2003. V. 30. P. 999–1036.
DOI: 10.1071/PP98096.
- Igamberdiev A. U., Hill R. D.* Plant mitochondrial function during anaerobiosis // *Annals of Botany*. 2008. V. 103. P. 259–268.
DOI: 10.1093/aob/mcn100
- Klok E. J., Wilson I. W., Wilson D., Chapman S. C., Ewing R. M., Somerville S. C., Peacock W. J., Dolferus R., Dennis E. S.* Expression profile analysis of the low-oxygen response in Arabidopsis root cultures // *Plant Cell*. 2002. V. 14. P. 2481–2494.
DOI: 10.1105/tpc.004747
- Limami A. M., Diab H., Lothier J.* Nitrogen metabolism in plants under low oxygen stress // *Planta*. 2014. V. 239. P. 531–541.
DOI: 10.3390/plants5020025
- Masclaux-Daubresse C., Reisdorf-Cren M., Pageau K., Lelandais M., Grandjean O., Kronenberger J., Valadier M.-H., Feraud M., Joulet T., Suzuki A.* Glutamine synthetase–glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco // *Plant Physiol.* 2006. V. 140. P. 444–456.
DOI: 10.1104/pp.105.071910
- Miyashita Y., Good A.* NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of Arabidopsis thaliana during dark-induced carbon starvation // *Journal of Experimental Botany*. 2008. V. 59. P. 667–680.
DOI: 10.1093/jxb/erm340
- Nicot N., Hausman J.-F., Hoffmann L., Evers D.* House-keeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress // *J. of Exp. Bot.* 2005. V. 56. P. 2907–2914.
DOI: 10.1093/jxb/eri285
- Ramirez-Gonzalez R. H., Borrill P., Lang D., Harrington S. A., Brinton J., Venturini L., Davey M., Jacobs J., van Ex F., Pasha A., Khedikar Y., Robinson S. J., Cory A. T., Florio T., Concia L., Juery C., Schoonbeek H., Steuernagel B., Xiang D., Ridout C. J., Chalhou B., Mayer K. F. X., Benhamed M., Latrasse D., Bendahmane A., Wulff B. B. H., Appels R., Tiwari V., Datla R., Choulet F., Pozniak C. J., Provart N. J., Sharpe A. G., Paux E., Spannagl M., Bräutigam A., Uauy C.* The transcriptional landscape of polyploid wheat // *Science*. 2018. V. 361: eaar6089.
DOI: 10.1126/science.aar6089
- Sarasketa A., Gonzalez-Moro M. B., Gonzalez-Murua C., Marino D.* Nitrogen source and external medium pH interaction differentially affects root and shoot metabolism in Arabidopsis // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7:29.
DOI: 10.3389/fpls.2016.00029
- Seok H.-Y., Tran H. T., Lee S.-Y., Moon Y.-H.* AtERF71/HRE2, an Arabidopsis AP2/ERF transcription factor gene, contains both positive and negative cis-regulatory elements in its promoter region involved in hypoxia and salt stress responses // *Int J Mol Sci.* 2022. V. 23: 5310.
DOI: 10.3390/ijms23105310
- Shelp B. J., Mullen R. T., Waller J. C.* Compartmentation of GABA metabolism raises intriguing questions // *Trends Plant Sci.* 2012. V. 17. P. 57–59.
DOI: 10.1016/j.tplants.2011.12.006
- Sievers F., Higgins D. G.* Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences // *Methods Mol Biol.* 2014. V. 1079. P. 105–116.
DOI: 10.1007/978-1-62703-646-7_6
- Terce-Laforgue T., Mack G., Hirel B.* New insights towards the function of glutamate dehydrogenase revealed during source-sink transition of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants grown under different nitrogen regimes // *Physiol. Plant.* 2004. V. 120. P. 220–228.
DOI: 10.1111/j.0031-9317.2004.0241.x.
- Turchi L., Baima S., Morelli G., Ruberti I.* Interplay of HD-Zip II and III transcription factors in auxin-regulated plant development // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. P. 5043–5053.
DOI: 10.1093/jxb/erv174
- Van Dongen J. T., Licausi F.* Oxygen sensing and signaling // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2015. V. 66. P. 345–367.
DOI: 10.1146/annurev-arplant-043014-114813
- Vartapetian B., Jackson M.* Plant adaptations to anaerobic stress // *Annals of Botany*. 1997. V. 79. P. 3–20.
DOI: 10.1093/oxfordjournals.aob.a010303
- Wenger R. H., Stiehl D. P., Camenisch G.* Integration of oxygen signaling at the consensus HRE // *Sci. STKE*. 2005. V. 306: re12.
DOI: 10.1126/stke.3062005re12
- Xia X., Kungr A. L.* Preferential binding of HIF-1 to transcriptionally active loci determines cell-type specific response to hypoxia // *Genome Biol.* 2009. V. 10: R113.
DOI: 10.1186/gb-2009-10-10-r113
- Yang C. Y., Hsu F.-C., Li J.-P., Wang N.-N., Shih M.-C.* The AP2/ERF transcription factor AtERF73/HRE1 modulates ethylene responses during hypoxia in Arabidopsis // *Plant Physiol.* 2011. V. 156. P. 202–212.
DOI: 10.1104/pp.111.172486

Molecular aspects of regulation of expression of homeologic glutamate dehydrogenase genes in wheat leaves under hypoxia

© 2023 D. N. Fedorin, A. T. Eprintsev[@]

*Voronezh State University,
Universitetskaya sq., 1, Voronezh, 394018 Russia
[@]E-mail: bc366@bio.vsu.ru*

An increase in GDH activity has been established when plants are exposed to hypoxic conditions in the first 6 hours, which ensures the formation of an adaptive response of cellular metabolism to the lack of oxygen in the cell. A difference in the transcriptional activity of homeologous *GDH-1* genes in wheat leaves under stress conditions was shown. An increase in the mRNA content of the *GDH-1(5A)* gene in wheat leaves when plants are exposed to hypoxic conditions is observed in the first hours of the experiment, which correlates with a change in the catalytic activity of glutamate dehydrogenase. Regulation of this gene is carried out by the transcription factor HIF, the specific landing site of which is found in the transcription initiation site of the promoter of this gene.

Keywords: glutamate dehydrogenase, wheat, hypoxia, regulation, gene, expression, promoter

УДК 576.895.133

**ПЕРВЫЕ СВЕДЕНИЯ ОБ УЛЬТРАТОНКОМ СТРОЕНИИ
ТЕГУМЕНТА “ЦИСТАКАНТА” СКРЕБНЯ
NEOECHINORHYNCHUS BERINGIANUS MIKHAILOVA,
ATRASHKEVICH, 2008
(EOACANTHOCEPHALA, NEOECHINORHYNCHIDAE)**

© 2024 г. К. В. Кусенко*, @, В. П. Никишин*, @

*Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, ул. Портовая, 18, Магадан, 685000 Россия

@E-mail: kusenko.kseniya@yandex.ru

@E-mail: nikishin@ibpn.ru

Поступила в редакцию 22.08.2023 г.

После доработки 03.11.2023 г.

Принята к публикации 03.11.2023 г.

Впервые для представителей класса Eoacanthocephala изучена ультраструктура тегумента метасомы развивающегося скребня *Neoechinorhynchus beringianus* (Neoechinorhynchidae). Показано, что у полностью сформированных акантелл этого вида отсутствует циста, характерная для цистакантов подобных стадий развития у представителей других классов скребней, и функцию защиты от ответной реакции хозяина выполняет толстый слой гликокаликса на поверхности тегумента. Тегумент представлен типичным сим-пластом, включает стандартный набор слоев (поперечно-полосатый, войлочно-волокнистый, радиально-волокнистый и трубчатый) и подстилается базальной пластинкой и двумя слоями мышц. Отсутствие у исследованных развитых акантелл цисты не позволяет применять к ним термин “цистакант”.

Ключевые слова: *Neoechinorhynchus beringianus*, цистакант, акантелла, тегумент, гликокаликс, световая микроскопия, электронная микроскопия.

DOI: 10.31857/S1026347024050054, **EDN:** uloimp

Покров паразитических червей, включая скребней (акантоцефалов), представляет собой уникальное образование, позволяющее, с одной стороны, осуществлять обменные процессы с окружающей средой/организмом хозяина, с другой, защищаться от ответной негативной реакции хозяина. Доминирующую роль в выполнении этих функций, безусловно, выполняет поверхностный участок покрова, имеющий непосредственный контакт с окружающей средой. Поскольку акантоцефалы являются биогельминтами и характеризуются сложными жизненными циклами с участием нескольких хозяев, их покров должен быть адаптирован ко всем хозяевам.

Морфология покрова взрослых скребней изучена на примере нескольких, преимущественно модельных, видов с применением как световой, так и электронной микроскопии; эти результаты обобщены в ряде обзоров (Meyer, 1933; Nicholas, 1967; Богоявленский, Иванова, 1978; Miller, Dunagan, 1985; Herlyn, 2000; Taraschewski, 2000; Никишин, 2004; и др.). Значительно меньше работ было посвящено изучению ультратонкого строения

акантелл, развивающихся в промежуточных хозяевах, и цистакантов, причем в большинстве случаев объектами этих исследований были представители классов Palaeacanthocephala и Archiacanthocephala (Butterworth, 1969; Marchand, Grita-Timoulali, 1992; Никишин, 2004). Свето-микроскопическое строение покровов у представителей класса Eoacanthocephala на разных стадиях жизненного цикла изучено на примерах нескольких видов рода *Neoechinorhynchus* (Богоявленский, Иванова, 1978; Al-Sady, 2009; Lourenco *et al.*, 2018; и др.). Сведения же об ультраструктуре покровов у взрослых представителей этого класса ограничены результатами детального исследования стенки тела скребня *Octospinifer macilentus* с применением трансмиссионного электронного микроскопа (Beermann *et al.*, 1974) и переднего и заднего участков тела скребня *Neoechinorhynchus cephalic* с применением сканирующей электронной микроскопии (Kaur, Sanil, 2021); ультраструктура же акантелл скребней этого класса остается не изученной. В настоящем сообщении представлены первые результаты изучения покрова метасомы поздней акантеллы

скребня *Neoechinorhynchus beringianus* Mikhailova, Atrashkevich, 2008 с использованием световой и трансмиссионной электронной микроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вид *N. beringianus* описан от девятииглой колюшки *Pungitius pungitius* Linnaeus, 1758 — основного дефинитивного хозяина и, кроме Магаданской области, распространен на Чукотке, Аляске, Камчатке, Сахалине и в Приморье. К типичным местообитаниям паразита относятся речные старицы и водоемы на морском побережье, заселенные колюшками. В число его окончательных хозяев, помимо девятииглой колюшки, входят лососевые, хариусы, ряпушка, налим, подкаменщик, а промежуточными хозяевами служат мелкие пресноводные ракушкообразные рачки рода *Candona*.

Мы изучили полностью сформированных акантелл из остракод, собранных в озере Черное бассейна Верхней Колымы — уникальном очаге, в котором обитает изолированная популяция девятииглой колюшки. Живых скребней фиксировали в 2%-ном растворе глутарового альдегида на 0.1 М фосфатном буфере, постфиксировали в 1–2%-ном растворе тетраоксида осмия на 0.2 М буфере, обезвоживали и заключали в смесь эпон и аралдита. В процессе обезвоживания образцы контрастировали 1%-ным раствором уранилацетата в 70%-ном спирте в течение ночи. Тотальные препараты и полутонкие срезы, окрашенные смесью метиленового синего и кристаллического фиолетового, просматривали в световых микроскопах Carl Zeiss Imager.D1 и Olympus CX41 и фотографировали цифровыми фотоаппаратами AxioCam MRc (Zeiss) и Olympus E-420, соответственно. Тонкие срезы просматривали в электронном микроскопе JEM 1400 Plus. Все полученные фотографии обрабатывали с использованием пакета программ Corel DRAW Graphics Suite X5.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рисунке 1а представлен общий вид акантеллы с промежуточным хозяином; на рисунке 1б — ее поперечный срез. Покров изученных акантелл представляет собой типичный симпластический тегумент, толщиной до 30 мкм (рис. 1). Снаружи тегумент покрыт слоем гликокаликса (рис. 1в, г), толщиной до 1 мкм, в составе которого визуальн

состоящим из тонких переплетающихся филаментов и электронно-плотных зерен.

Поверхность тегумента покрыта цитоплазматической мембраной, сливающейся с тонким электронно-плотным покровным комплексом (10–20 нм толщиной) (рис. 1г), структура которого на имеющихся препаратах не определяется. Глубже

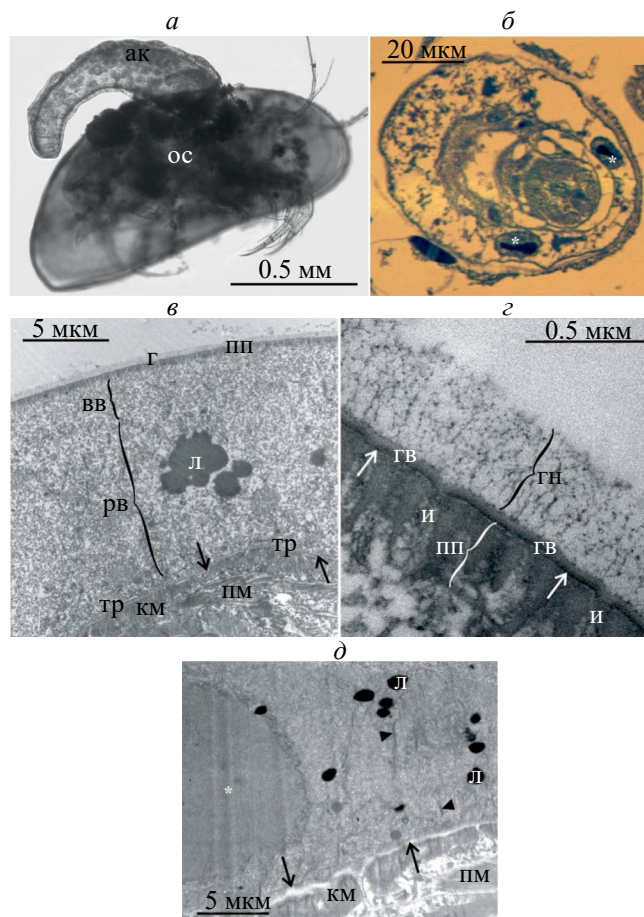


Рис. 1. Акантеллы скребня *N. beringianus* (а — самка, в-д — самцы; а-б — световая микроскопия, в-д — электронная микроскопия). а — Остракода р. *Candona* с выделившейся акантеллой в связи с механическим повреждением раковины промежуточного хозяина; б — акантелла в промежуточном хозяине; в — общий вид тегумента метасомы; г — ядерный участок тегумента метасомы; д — наружный участок тегумента метасомы. ак — Акантелла; вв — ойлочно-волоконный слой тегумента; г — гликокаликс; гв — внутренний слой гликокаликса; гн — наружный слой гликокаликса; и — инвагинаты поперечно-полосатого слоя; км — слой кольцевых мышц; л — липиды; ос — остракода; пм — слой продольных мышц; пп — поперечно-полосатый слой тегумента; рв — радиально-волоконный слой тегумента; тр — трубчатый слой тегумента; стрелка белая — покровный комплекс; головка стрелки черная — волокна радиально-волоконного слоя тегумента; звездочка — ядра тегумента.

в составе тегумента отчетливо различаются поперечно-полосатый, войлочно-волоконистый, радиально-волоконистый и трубчатый слои (рис. 1в).

Поперечно-полосатый слой, толщиной 0.35–0.40 мкм, характеризуется многочисленными инвагинатами наружной цитоплазматической мембраны. Диаметр инвагинатов колеблется в пределах 50–80 нм; —их содержимое электронно-светлое неясной структуры. Цитоплазма слоя более плотная, чем в других участках тегумента (рис. 1г).

Войлочно-волоконистый слой, толщиной около 2.5 мкм, имеет неясную исчерченность в более или менее продольном направлении. В составе этого слоя выявляются многочисленные волокна, ориентированные параллельно тегументу, митохондрии и везикулы различного диаметра (рис. 1в).

Радиально-волоконистый слой самый толстый, толщиной 10–15 мкм, также не имеет отчетливых границ и характеризуется наличием лакун, тегументных ядер, липидных капель и везикул, визуально менее многочисленных, чем в войлочно-волоконистом слое (рис. 1в). Кроме того в этом слое чаще, чем в других слоях наблюдаются радиально ориентированные волокна, пронизывающие тегумент от его внутренней цитоплазматической мембраны до покровного комплекса.

Количество ядер у скребней исследуемого вида постоянное — пять дорзальных и одно вентральное. Ядра характеризуются округлой или овальной формой, слегка волнистой оболочкой и включают по одному ядрышку грушевидной (реже гантелевидной) формы, отчетливо наблюдаемых на светомикроскопических препаратах (рис. 1б). Наибольший диаметр одного из ядер на электроннограмме составил 14 мкм (рис. 1д).

Толщина трубчатого слоя не превышает 1.5 мкм (рис. 1в). Он образован множеством инвагинатов цитоплазматической мембраны, изнутри ограничивающей тегумент. В цитоплазме этого слоя наблюдаются многочисленные пузырьки, предположительно являющиеся расширенными окончаниями инвагинатов.

Под тегументом располагаются слои кольцевых и продольных мышц, отделенные от тегумента базальной пластинкой (рис. 1в, д).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гистологическая организация тегумента взрослых скребней *N. beringianus*, а также его ультраструктура были рассмотрены ранее (Кусенко и др., 2012; Кусенко, Никишин, 2013а, б). Особенности тегумента исследованных здесь акантелл в сравнении со взрослыми червями являются ожидаемые размерные различия, а также морфология тегументных ядер. В настоящем исследовании мы не обнаружили массивных внутриядерных включений, отмеченных

в ядрах взрослых червей, а сами ядра характеризуются более правильными округлыми очертаниями и меньшими размерами. Изменение морфологии этих ядер у взрослых червей, возможно, связано с ростом паразитов в окончательном хозяине.

Наличие толстого слоя гликокаликса на поверхности тегумента полностью сформированных цистакантов характерно для скребней классов *Palaeacanthocephala* и *Archiacanthocephala* (Wright, Lumsden, 1968; Никишин, 1986; Никишин и др., 1994; Dezfuli, Giari, 1999; и др.). Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что и представители класса *Eoacanthocephala*, по крайней мере, вид *N. beringianus*, не являются исключением. Таким образом, подтверждается ранее высказанное предположение, что толстый слой гликокаликса на поверхности тегумента является особенностью тканевых форм, как минимум, многих паразитических червей (Никишин, 2016, 2018). Можно предполагать, что столь развитый слой гликокаликса защищает тканевых паразитов от ответной клеточной реакции хозяина, например, от “гемоцитной атаки” в организме промежуточного хозяина (Никишин, 2016, 2018; и др.).

Наиболее примечательной особенностью исследованных акантелл является отсутствие цисты, окружающей цистакантов классов *Palaeacanthocephala* и *Archiacanthocephala* (Crompton, 1967; Mercer, Nicholas, 1967; Никишин, 1999, 2004; и др.). Вывод об отсутствии цисты у акантелл *Eoacanthocephala* ранее был сделан на основе результатов светомикроскопических исследований ряда других видов (Merritt, Pratt, 1964; Harms, 1965; Cable, Dill, 1967; Uglem, Larson, 1969; и др.), однако однозначное подтверждение этого факта с применением электронной микроскопии получено впервые. Более того, у исследованных акантелл не обнаружен и механизм формирования цисты, обязательными компонентами которого, например, у представителей класса *Palaeacanthocephala* являются микроворсинки на поверхности тегумента (Nikishin, 1992). Таким образом, отсутствие цисты у исследованных скребней, достигших стадии, инвазионной для окончательного хозяина, не позволяет именовать их термином “цистакант”; предпочтительнее использовать термин “акантелла” (Петроченко, 1956; и др.) или “сформированная акантелла”.

Функция цисты, по мнению большинства исследователей, заключается в защите развивающейся акантеллы от гемоцитного ответа промежуточного хозяина (Lackie, 1975; Nickol, 1985; Никишин, 1999; и др.). Защитную функцию, но предположительно более многообразную, выполняет также толстый слой гликокаликса, характерный для стадий жизненного цикла, предшествующих стадии жизни в окончательном хозяине (Никишин, 2016; 2018). В частности, участие цисты и гликокаликса в защите от гемоцитной атаки организма промежуточного

хозяина (ракообразного) экспериментально показано на примере цистицеркоидов цестод (Никишин, Лебедев, 2011). Можно предполагать, что у акантелл класса Eoacanthocephala защитные функции отсутствующей цисты принимает на себя гликокаликс.

По всей вероятности, отсутствие цисты является характерной особенностью сформированных акантелл других видов класса Eoacanthocephala. В таком случае стратегия взаимоотношений с промежуточными хозяевами акантелл класса Eoacanthocephala, не имеющих цисту, должна отличаться от стратегии взаимоотношений с промежуточными хозяевами цистакантов скребней классов Palaacanthocephala и Archiacanthocephala, формирующих цисту как дополнительную защитную структуру. Будущие исследования должны подтвердить или опровергнуть это предположение.

Авторы выражают благодарность Е.И. Михайловой за любезно предоставленную фотографию к рисунку (Рис. 1а).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследования проведены при выполнении государственного задания «Гельминты в биоценозах Северо-Восточной Азии: биоразнообразие, морфология и молекулярная филогенетика» (номер регистрации 1021060307693-0).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Для достижения целей данного исследования не требовалось одобрения комитетов по этике исследований, поскольку экспериментальная работа проводилась с нерегулируемыми видами беспозвоночных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Богоявленский Ю.К., Иванова Г.В. Микроструктура тканей скребней. М.: Наука, 1978. 217 с.
- Кусенко К.В., Михайлова Е.И., Никишин В.П. Гистология покровных тканей скребня *Neoechinorhynchus beringianus* // Вестник Северо-Восточного государственного университета. 2012. Вып. 18. С. 40–48.
- Кусенко К.В., Никишин В.П. Ультраструктура тегумента метасомы скребней класса Eoacanthocephala на примере *Neoechinorhynchus beringianus*. Материалы V Всероссийского съезда Паразитологического общества при РАН “Паразитология в изменяющемся мире”. Новосибирск, 2013а. С. 102.
- Кусенко К.В., Никишин В.П. Ультраструктура покровов метасомы скребня *Neoechinorhynchus beringianus*, ассоциированного с бактериями. Материалы докладов Всероссийской научной конференции “Чтения памяти академика К.В. Симакова”. Магадан: СВНЦ ДВО РАН, 2013б. С. 145–147.
- Никишин В.П. Тонкое строение стенки метасомы цистаканта скребня *Polymorphus strumosoides* (Acanthocephala, Polymorphidae) // Паразитология. 1986. Т. 20. Вып. 5. С. 403–408.
- Никишин В.П. Циста вокруг личинок акантоцефалов как элемент хозяинно-паразитарного пространства. В кн.: Наука на северо-востоке России. К 275-летию российской академии наук. Магадан, СВНЦ ДВО РАН, 1999. С. 139–149.
- Никишин В.П. Цитоморфология скребней: покровы, защитные оболочки, эмбриональные личинки. М.: ГЕОС, 2004. 233 с.
- Никишин В.П. Модификации гликокаликса скребней // Известия РАН. Серия биологическая. 2018. № 1. С. 42–54. DOI: 10.7868/S000233291801006X
- Никишин В.П., Плужников Л.Т., Леонов С.А. Ультраструктура покровов цистакантов *Polymorphus magnus* (Acanthocephala, Polymorphidae) // Паразитология. 1994. Т. 28. № 1. С. 52–59.
- Петроченко В.И. Акантоцефалы (скребни) домашних и диких животных. М.: Изд-во АН СССР, 1956. Т. 1. 436 с.
- Al-Sady R.S. The life cycle and larval development of *Neoechinorhynchus iraqensis* // Al-Haitman Journal for Pure and Applied Science. 2009. V. 22. № 2. P. 9–14.
- Beermann I., Arai H.P., Costerton J.W. The ultrastructure of the lemnisci and body wall of *Octospinifer macilentus* (Acanthocephala) // Canadian Journal of Zoology. 1974. V. 52. № 5. P. 533–535.
- Butterworth P. The development of the body wall of *Polymorphus minutus* (Acanthocephala) in its intermediate host *Gammarus pulex* // Parasitology. 1969. V. 59. P. 373–388.
- Cable R.M., Dill W.T. The morphology and life history of *Pallisentis fractus* Van Cleave and Bangham, 1949 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) // Journal of Parasitology. 1967. V. 53. № 4. P. 810–817.
- Crompton D.W.T. Studies on the haemocytic reaction of *Gammarus* spp., and its relationship to *Polymorphus minutus* (Acanthocephala) // Parasitology. 1967. V. 57. P. 389–401.
- Dezfuli B.S., Giari L. Amphipod intermediate host of *Polymorphus minutus* (Acanthocephala), parasite of water birds, with notes on ultrastructure of host-parasite interface // Folia parasitologica. 1999. V. 46. № 2. P. 117–122.
- Harms C.E. The life cycle and larval development of *Octospinifer macilentus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) // Journal of Parasitology. 1965. V. 51. № 2. P. 286–293.
- Herlyn H. Zur Ultrastruktur, Morphologie und Phylogenie der Acanthocephala. Berlin: Logos Verlag Berlin, 2000. 131 p.

- Kaur P., Sanil N. Morphological and molecular characterization of *Neoechinorhynchus* (*N.*) *cephali* n. sp. (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) Stiles and Hassall 1905 infecting the flathead grey mullet *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758) from the southwest coast of India // Parasitology Research. 2021. V. 120. P. 3123–3136.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07252-2>
- Lackie A.M. The activation of infective stages of endoparasites of vertebrates // Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society. 1975. V. 50. № 3. P. 285–323.
- Lourenço F.S., Morey G.A.M., Malta J.C.O. The development of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) in its intermediate host *Cypridopsis vidua* in Brazil // Acta Parasitologica. 2018. V. 63. № 2. P. 354–359.
DOI: 10.1515/ap-2018-0040
- Marchand B., Grita-Timoulali Z. Comparative ultrastructural study of the cuticle of larvae and adults of *Centrorhynchus milvus* Ward, 1956 (Acanthocephala, Centrorhynchidae) // Journal of Parasitology. 1992. V. 78. № 2. P. 355–359.
- Meyer A. Acanthocephala. In: Dr H.G. Bronn's Klassen und Ordnungen des Tierreichs. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft MBH, 1933. Bd. 4. Abt. 2. Buch 2. Lief 2. S. 333–582.
- Mercer E.H., Nicholas W.L. Ultrastructure of the capsule of the larval stages of *Moniliformis dubius* (Acanthocephala) in the cockroach *Periplaneta americana* // Parasitology. 1967. V. 57. № 1. P. 169–174.
- Merritt S.V., Pratt I. The life history of *Neoechinorhynchus rutili* and its development in the intermediate host (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) // Journal of Parasitology. 1964. V. 50. № 3. P. 394–400.
- Miller D.M., Dunagan T.T. Functional morphology. In: Biology of the Acanthocephala. Edited by D.W.T. Crompton, B.B. Nickol. Cambridge University Press, 1985. P. 73–123.
- Nicholas W.L. The biology of the Acanthocephala // Advances in Parasitology. 1967. V. 5. P. 205–315.
- Nickol B.B. Epizootiology. In: Biology of Acanthocephala. Edited by D.W.T. Crompton, B.B. Nickol. Cambridge University Press, 1985. P. 307–346.
- Nikishin V.P. Formation of the capsule around *Filicollis anatis* (Acanthocephala) in its intermediate host // Journal of Parasitology. 1992. V. 78. № 1. P. 127–137.
- Nikishin V.P. Morphofunctional diversity of glycocalyx in tapeworms // Biology Bulletin Reviews. 2017. V. 7. № 2. P. 160–177.
DOI: 10.1134/S2079086417020050
- Nikishin V.P., Lebedev D.V. Experimental evidence of the defense role of the exocyst in the metacystode of *Microssomacanthus lari* Belogurov et Kulikov, in Spasskaja, 1966 (Cestoda: Hymenolepididae) // Russian Journal of Marine Biology. 2011. V. 37. № 1. P. 80–83.
DOI: 10.1134/S106307401101010X
- Taraschewski H. Host-parasite interactions in Acanthocephala: a morphological approach // Advances in Parasitology. 2000. V. 46. P. 1–179.
- Uglen G.L., Larson O.R. The life history and larval development of *Neoechinorhynchus saginatus* Van Cleave and Bangham, 1949 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) // Journal of Parasitology. 1969. V. 55. № 6. P. 1212–1217.
- Wright R.D., Lumsden R.D. Ultrastructural and histochemical properties of the acanthocephalan epicuticle // Journal of Parasitology. 1968. V. 54. № 6. P. 1111–1123.

First knowledge on the ultrathin structure of the tegument “Cystacanth” of the acanthocephala *Neoechinorhynchus beringianus* Mikhailova, Atrashkevich, 2008 (Eoacanthocephala, Neoechinorhynchidae)

K. V. Kusenko[#], V. P. Nikishin[#]

Institute of Biological Problems of the North, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences,

st. Portovaya, 18, Magadan, 685000 Russia

[#]E-mail: kusenko.kseniya@yandex.ru

[#]E-mail: nikishin@ibpn.ru

For the first time, the ultrastructure of the metasoma tegument of the developing acanthocephalan *Neoechinorhynchus beringianus* (Neoechinorhynchidae) was studied at representatives of the Eoacanthocephala class. Completely developed acanthellae of this species were shown to have no cyst, which is a characteristic feature of cystacanths of similar development stages in representatives of other acanthocephalan classes; and the protection function from the host response is performed by a thick layer of glycocalyx on the tegument surface. The tegument is represented by a typical symplast, including a standard set of layers (cross-striated, felt-fibrous, radially fibrous and tubular), and is underlain by a basal plate and two layers of muscles. The absence of a cyst in the completely developed acanthellae under study does not allow using the term “cystacanth” concerning them.

Keywords: *Neoechinorhynchus beringianus*, cystacanthus, acanthella, tegument, glycocalyx, light microscopy, electron microscopy

УДК 597.552.5+595.121.31: 612.017.11:612.112.9

ЛЕЙКОЦИТАРНЫЙ СОСТАВ ИММУННЫХ ОРГАНОВ *COREGONUS MIGRATORIUS*, ЗАРАЖЕННОГО *DIBOTHRIOCEPHALUS DENDRITICUS*

© 2024 г. О. Е. Мазур[®], И. А. Кутырев, Л. В. Толочко

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, ул. Сахьяновой, 6, Улан-Удэ, 670047 Россия
[®]E-mail: olmaz33@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.11.2023 г.

После доработки 12.02.2024 г.

Принята к публикации 12.02.2024 г.

Впервые представлен анализ лейкоцитарных изменений в иммунных органах (пронефрос, мезонефрос и селезенка) байкальского омуля *Coregonus migratorius* (Georgi, 1775) (Salmoniformes: *Coregonidae*), зараженных *Dibothriocephalus dendriticus* (Nitsch, 1824) (син. *Diphyllbothrium dendriticum*) (Cestoda: *Diphyllbothriidea*) в естественных условиях среды обитания. В пронефросе зараженных рыб число малодифференцированных нейтрофилов (миелоцитов и метамиелоцитов) было значимо выше, чем у незараженных особей, что указывало на воспалительные процессы. Снижение общего числа лимфоцитов и пролимфоцитов (В-лимфоцитов) в пронефросе и увеличение числа пролимфоцитов в селезенке у зараженных рыб свидетельствовало о запуске процессов иммунорегуляции. Другие эффекторные элементы (клетки моноцитарно-макрофагальной линии, базофилы и эозинофилы) не участвовали в противопаразитарной защите.

Ключевые слова: *Coregonidae*, байкальский омуль, почка, селезенка, иммунный ответ, *Diphyllbothriidea*
DOI: 10.31857/S1026347024050062, **EDN:** ulhvqo

Dibothriocephalus dendriticus (Nitsch, 1824) (син. *Diphyllbothrium dendriticum*) (Cestoda: *Diphyllbothriidea*) является паразитом лососевых рыб на стадии плероцеркоида (второй промежуточный хозяин) и на рыбоядных птицах на стадии имаго (окончательный хозяин) в Голарктике и Палеарктике (Куклина, Куклин, 2016; Scholz, Kuchta, 2016), первыми промежуточными хозяевами служат пресноводные копеподы (Делямуре и др., 1985). *D. dendriticus* также использует млекопитающих в качестве своих естественных окончательных хозяев (Scholz, Kuchta, 2016). Человек заражается этим паразитом при употреблении в пищу сырой или частично приготовленной рыбы, содержащей плероцеркоиды, что обосновывает большое эпидемиологическое значение этого паразита.

Байкальский омуль (*Coregonus migratorius*, Georgi, 1775) (Salmoniformes: *Coregonidae*) – сиговая рыба, эндемичная для озера Байкал (Восточная Сибирь, Россия) (Teterina *et al.*, 2020), является значимым видом в формировании биоразнообразия ихтиофауны озера. Благодаря своей высокой промысловой ценности он является широко эксплуатируемым видом (Базов, Базова, 2016). Байкальский омуль также занимает доминирующую позицию как второй промежуточный хозяин *D. dendriticus*,

составляя 99% всей гемипопуляции цестод (Пронин и др., 2009).

В организме хозяина мигрирующие плероцеркоиды проникают через стенку желудочно-кишечного тракта и инкапсулируются во внешней оболочке. Наиболее распространенными локациями являются пищевод, желудок, пилорические отростки, печень и висцеральный жир (Пронина, Пронин, 1988; Togges *et al.*, 2012). У промежуточных хозяев в зависимости от локализации, *Dibothriocephalus* spp. оказывают различные патологические эффекты, есть данные об элиминации зараженных рыб (Hoffman, Dunbar, 1961; Rodger, 1991; Sharp *et al.*, 1992; Rahkonen *et al.*, 1996; Santoro *et al.*, 2013). Имеется широкий ряд гистопатологических исследований внутренних органов зараженных рыб (Пронина, Пронин, 1988; Фомина, Пронина, 2015), однако системный иммунный ответ омуля и других представителей семейства лососевых при этой инвазии изучен мало. Лишь в нескольких исследованиях рассматривалось влияние *D. dendriticus* на иммунную систему рыб. В этих работах в экспериментальных условиях *in vitro* были описаны иммунорегуляторные вещества, секретируемые цестодами и популяциями клеток рыб, участвующих в иммунном ответе против паразита (Sharp *et al.*, 1992; Dezfili

et al., 2007; Kutuyev *et al.*, 2014; 2017), а также индукция специфических антител у рыб при естественном заражении дифиллоботридами (Sharp *et al.*, 1989). В то же время многие вопросы, связанные с функционированием иммунной системы в условиях естественной инвазии этими цестодами, остаются открытыми.

Несмотря на очевидную патогенность цестод, им не выгодно убивать своего хозяина (Sitjà-Bobadilla, 2008). Они также используют различные методы, чтобы обойти иммунный ответ, что позволяет им выживать в организме хозяина в течение длительных периодов времени. В зараженном организме активируется ряд иммунных защитных механизмов: врожденных и адаптивных. Почки и селезенка рыб являются основными органами иммунного ответа. Лейкоциты, входящие в состав этих органов, играют решающую эффекторную роль в иммунном ответе (Лапирова и др., 2017; Nakanishi *et al.*, 2018). Важным звеном врожденной иммунной системы рыб, принимающим участие в противопаразитарной защите, является гранулоцитарный росток гемопоэза (Alvarez-Pellitero, 2008). Так, повышенная мобилизация и активация нейтрофилов и эозинофилов была обнаружена у карповых при инвазии *Bothriocephalus acheilognathi* (Nie, Hoole, 2000), активация нейтрофилов была обнаружена у радужной форели при дифиллоботриозе (Sharp *et al.*, 1992) и европейских угрей при заражении *Anguillicola crassus* (Knopf *et al.*, 2008). В настоящее время известно, что адаптивный иммунитет у костистых рыб характеризуется наличием Т- и В-лимфоцитов, иммуноглобулинов, Т-клеточных антигенных рецепторов и молекул главного комплекса гистосовместимости (Alvarez-Pellitero, 2008; Nakanishi *et al.*, 2018; Stosik *et al.*, 2021). В последние годы, достигнут значительный прогресс в понимании специфических иммунных механизмов у рыб в ответ на паразитарную инвазию (Dezfuli *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2019; Scholz *et al.*, 2021; Buchmann, 2022). Однако эти знания ограничены и варьируются в зависимости от вида рыб и факторов окружающей среды, влияющих на возникновение и распространение болезней у рыб. В целом, именно отсутствие информации об этих явлениях сдерживает разработку эффективных методов борьбы с паразитарными заболеваниями.

Наша работа является частью серии работ по изучению взаимоотношений в системе «*C. migratorius* — *D. dendriticus*», в которой впервые приведены сведения об изменениях лейкоцитарного состава основных иммунных органов байкальского омуля, незараженного и зараженного цестодой в естественных условиях среды обитания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемый биологический материал был получен от особей байкальского омуля придонного глубоководного морфотипа в октябре 2008 г. (р. Селенга, Байкальский бассейн, Кабанский район, Республика Бурятия). В выборку вошли зараженные *D. dendriticus* ($n = 10$) и незараженные ($n = 10$) особи одинакового размера и возраста. Для всех рыб проведен морфобиологический анализ, включающий измерение длины тела по Смиту, измерение массы тела (Правдин, 1966) и определение возраста (Чугунова, 1959) (табл. 1). Возраст рыб определяли по количеству годовых колец на чешуе рыб с помощью микроскопа при увеличении 2X.

В полевых условиях у каждой рыбы, наркотизированной бензокаином (1 г/10 л), отбирали образцы тканей почек (пронефрос и мезонефрос) и селезенки. Кожу, плавники и жабры каждой рыбы исследовали на наличие эктопаразитов. Затем глаза, мышцы, полость тела, внутренние органы рыб препарировали и исследовали на наличие эндопаразитов. Гельминтов исследовали в чашках Петри с 0.65% физиологическим раствором для холоднокровных животных. Идентификацию паразитов проводили по существующим определителям (Бауэр, 1984, 1985, 1987). Полость тела и желудочно-кишечный тракт исследовали на наличие капсул, содержащих *D. dendriticus*. Плероцеркоиды цестод выделяли, переносили в 0.65%-ный физиологический раствор и с помощью игл удаляли из окружающих капсул. Морфологическая идентификация плероцеркоидов основывалась на форме и размерах сколекса и шейки стробилы (Делямуре и др., 1985; Бауэр, 1987). Интенсивность инвазии (экз.) и численность паразитов (экз.) использовались для количественной оценки заражения (Bush *et al.*, 1997).

Таблица 1. Морфометрические параметры байкальского омуля (*Coregonus migratorius*) зараженных и не зараженных *Dibothriocephallus dendriticus*

Показатель	Не зараженные рыбы	Зараженные рыбы
Длина тела до конца средних лучей хвостового плавника, мм	325–365	353–383
Вес полный, г	450–528	495–594
Возраст, годы	10–11	10–11
Число исследованных рыб, экз.	10	10

Примечание. Лимиты (минимум-максимум).

Таблица 2. Параметры зараженности байкальского омуля (*Coregonus migratorius*) паразитами

Паразит	Незараженные <i>D. dendriticus</i> рыбы		Зараженные <i>D. dendriticus</i> рыбы	
	ИИ	ИО	ИИ	ИО
<i>Dibothriocephalus dendriticus</i> (Nitsch, 1824)	0	0	11–33	17.9 (2.3)
<i>Proteocephalus longicollis</i> (Cestoda) (Zeder, 1800)	4–25	11.5 (9.5)	3–28	12.8 (7)
<i>Contracaecum osculatum baicalensis</i> (Nematoda) (Mozgovoi и Ryjikov, 1950)	1–3	0.6 (0)	1–3	0.5 (0)
<i>Diplostomum spp.</i> (Trematoda)	2	0.4 (0)	1	0.1 (0)
<i>Phyllodistomum umblae</i> (Trematoda) (Fabricius, 1780)	1–3	0.6 (0)	0	0
<i>Salmincola extumescens</i> (Crustacea) (Gadd, 1901)	0	0	1	0.1 (0)

Примечание. ИИ – интенсивность инвазии (лимиты), экз.; ИО – индекс обилия и медиана численного ряда паразитов (в скобках), экз.

и представлены в табл. 2. В связи с отсутствием рыб, свободных от гельминтов, и наличием у них смешанной инвазии, в сравниваемые группы вошли особи со схожей и минимальной интенсивностью заражения паразитами (табл. 2).

Образцы почки (пронефрос и мезонефрос) и селезенки использовали для изготовления отпечатков органов (по три препарата на рыбу). Отпечатки сушили на воздухе, фиксировали в красителе Май-Грюнвальда и затем окрашивали азур-эозином по методу Романовского-Гимзы (Сборник..., 1999). Подсчет клеток осуществляли с помощью светового микроскопа МС300 (Micros, Австрия) при увеличении в 1350 раз. Для каждой группы рыб (незараженных и зараженных) был проведен подсчет 3000 клеток.

Все процедуры, проводимые в этой работе, соответствуют этическим стандартам соответствующих национальных и институциональных руководств по уходу и использованию животных.

Данные анализировались с использованием пакета программ Statistica 6.0. Нормальность распределения количественных данных определяли с помощью теста Шапиро-Уилка и визуального контроля гистограмм. Группы данных, не являющиеся нормально распределенными, сравнивались с использованием критерия Манна–Уитни (the Mann–Whitney U-test).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Лейкоциты в иммунных органах всех особей байкальского омуля были представлены тремя группами клеток: бластными клетками (рис.), гранулоцитами и агранулоцитами. Гранулоциты находились на разных стадиях дифференцировки: промиелоциты, миелоциты, метамиелоциты, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы (рис. 1а), миелоциты и метамиелоциты базофильные (рис. 1а,б).

Агранулоциты были представлены лимфоидными и моноцитарными клеточными линиями. Лимфоидные клеточные линии состояли из пролимфоцитов и зрелых лимфоцитов (рис. 1а,в), тогда как моноцитарные линии были представлены промоноцитами и зрелыми моноцитами (рис. 1в).

Лимфоидные клеточные линии доминировали в лейкоцитарном составе пронефроса в обеих группах (табл. 3). На активацию лейкопоэза в кроветворной ткани указывало высокое число бластных клеток. Кроме того, обнаружены элементы моноцитарного и гранулоцитарного линий (нейтрофилы и базофилы). Число гранулоцитов у особей, зараженных *D. dendriticus*, значимо увеличилось в 1.6 раза по сравнению с таковыми в незараженной группе. Такой результат обусловлен увеличением числа нейтрофилов (в 1.6 раза), в основном нейтрофильных метамиелоцитов (в 1.1 раза). Напротив, число лейкоцитов в лимфоидных клеточных линиях значимо уменьшилось в 1.1 раза за счет числа пролимфоцитов (в 1.2 раза) (табл. 3).

В лейкоцитарном составе мезонефроса рыб, зараженных плероцеркоидами *D. dendriticus*, существенных изменений не наблюдалось (табл. 3), он характеризовался тем же соотношением популяций лейкоцитов, что и в пронефросе. Среди лейкоцитов туловищной почки количественно преобладали лимфоциты, затем бластные элементы и гранулоциты. Фиксировались единичные моноциты.

Среди лейкоцитов селезенки у всех исследуемых особей байкальского омуля преобладали лимфоциты, в том числе пролиферирующие молодые их формы (табл. 4). Различия по количеству бластных клеток между группами не были значимыми. Лейкоцитарный состав селезенки особей, зараженных *D. dendriticus*, отличался от такового у незараженных особей (табл. 4). Число нейтрофилов значимо снизилось в 2.5 раза преимущественно за счет малодифференцированных форм – миелоцитов

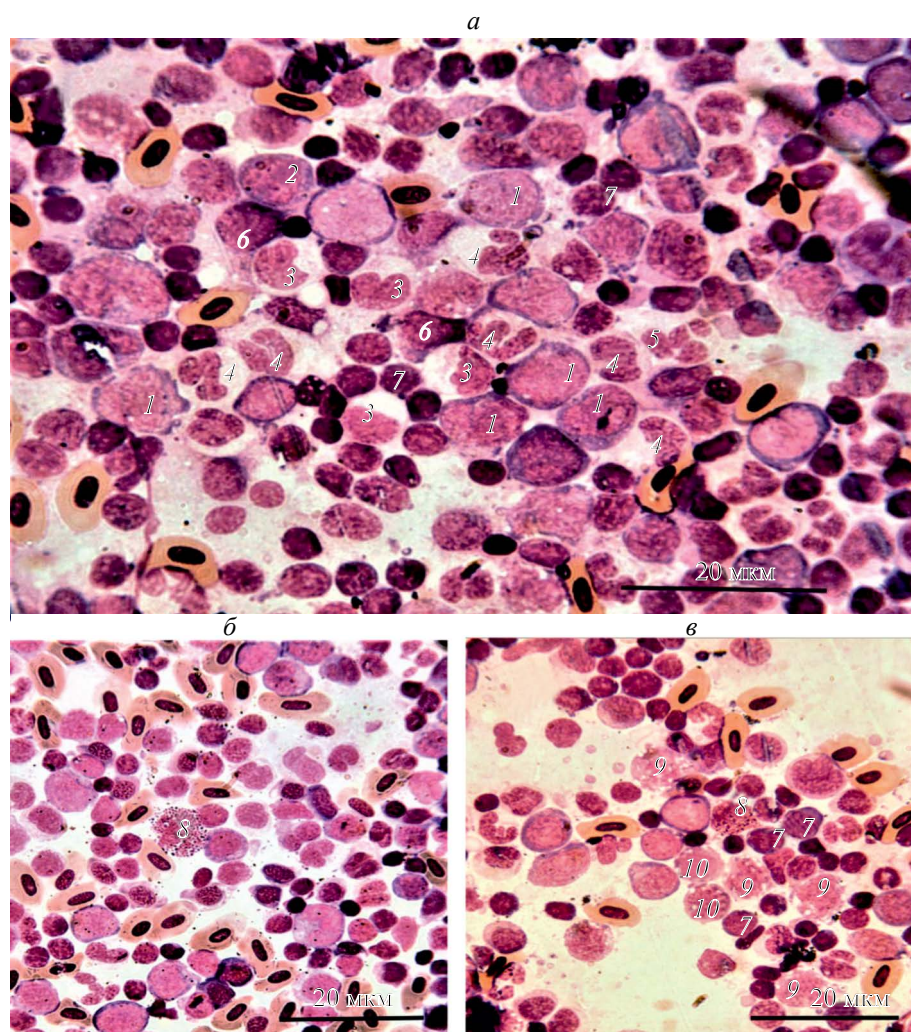


Рис 1. Лейкоциты proneфроса (а, б, в) *Coregonus migratorius*, окраска азур-эозином: 1 — бласт, 2 — миелоцит, 3 — метамиелоцит, 4 — палочкоядерный нейтрофил, 5 — сегментоядерный нейтрофил, 6 — пролимфоцит, 7 — лимфоцит, 8 — базофил, 9 — промоноцит, 10 — моноцит.

и метамиелоцитов, число которых уменьшилось в 2.9 и 2.2 раза соответственно. Число лейкоцитов в лимфоидных клеточных линиях значительно увеличилось в 1.1 раза главным образом за счет числа незрелых форм (пролимфоцитов) в 1.3 раза, напротив, процент зрелых лимфоцитов снизился в 2 раза.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В основе противогельминтного иммунитета у рыб лежат процессы трансформаций иммунокомпетентных клеток хозяина под влиянием антигенов, секретируемых паразитом. В этом контексте продукция, мобилизация и активация лейкоцитов являются наиболее важными фазами защитной реакции у рыб при паразитозах (Nie, Hoole, 2000;

Scharsack *et al.*, 2004; Knopf *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2019). Лейкоциты в иммунных органах рыб, происходящие из одной гемопоэтической стволовой клетки, пролиферируют и дифференцируются в гранулоцитарную, моноцитарную и лимфоцитарную линии (Kobayashi *et al.*, 2016). Эти клеточные элементы обнаруживают морфологические и цитохимические различия на разных стадиях своего созревания и дифференцировки. Это обстоятельство позволяет успешно идентифицировать их с помощью различных методов окраски (Иванова, 1983; Головина и др., 2003). Поскольку разработанных молекулярных маркеров клеток крови рыб не существует, а методами проточно-цитометрического исследования можно определить лишь ограниченное количество клеточных популяций (Inoue *et al.*, 2002; Franke *et al.*, 2014; Parrino *et al.*, 2018;

Таблица 3. Лейкоцитарный состав пронефроса и мезонефроса байкальского омуля (*Coregonus migratorius*) незараженных и зараженных *Dibothriocephallus dendriticus* ($M \pm mx$)

Показатель, %	Пронефрос			<i>P</i>	Мезонефрос		<i>P</i>
	незараженные рыбы	зараженные рыбы	тренд изменений		незараженные рыбы	зараженные рыбы	
Бластные клетки	12.3 ± 0.86	15.5 ± 2.03	—	0.80	8.0 ± 1.36	8.9 ± 1.95	0.65
Гранулоциты	7.3 ± 0.42	11.6 ± 1.29	↑	0.01	4.0 ± 0.69	4.0 ± 0.75	0.72
Нейтрофилы	7.2 ± 0.97	11.3 ± 1.68	↑	0.03	4.0 ± 0.69	4.0 ± 0.75	0.72
Миелоциты	0.8 ± 0.33	1.3 ± 0.42	—	0.3	0.9 ± 0.32	0.8 ± 0.29	0.72
Метамиелоциты	2.2 ± 0.36	3.7 ± 0.70	↑	0.04	1.0 ± 0.42	1.4 ± 0.56	0.58
Палочкоядерные	2.1 ± 0.53	2.9 ± 0.57	—	0.29	0.9 ± 0.32	0.8 ± 0.29	0.82
Сегментоядерные	2.1 ± 0.51	3.3 ± 0.97	—	0.26	1.2 ± 0.40	1.0 ± 0.37	0.71
Базофилы	0.1 ± 0.09	0.3 ± 0.14	—	0.29	0	0	—
Миелоциты	0	0.2 ± 0.12	—	0.11	0	0	—
Метамиелоциты	0.1 ± 0.09	0.1 ± 0.10	—	0.95	0	0	—
Агранулоциты	80.7 ± 1.58	72.9 ± 3.49	↓	0.04	88.0 ± 1.38	87.2 ± 1.54	0.68
Лимфоциты	80.0 ± 1.62	72.7 ± 3.49	↓	0.04	85.9 ± 1.51	84.8 ± 1.63	0.61
Пролимфоциты	70.2 ± 2.48	58.3 ± 4.45	↓	0.02	69.5 ± 2.24	68.9 ± 2.85	0.86
Лимфоциты (зрелые)	9.8 ± 2.11	14.3 ± 2.55	—	0.18	16.4 ± 1.75	15.8 ± 2.54	0.85
Моноциты	0.7 ± 0.25	0.2 ± 0.14	—	0.11	2.1 ± 0.71	2.4 ± 0.67	0.75
Промоноциты	0.1 ± 0.12	0.1 ± 0.07	—	0.65	1.7 ± 0.63	1.2 ± 0.47	0.48
Моноциты (зрелые)	0.6 ± 0.20	0.1 ± 0.13	—	0.37	0.4 ± 0.19	1.2 ± 0.37	0.15

Примечание. ($M \pm mx$) — среднее значение показателя и его ошибка. Тренд изменений: ↑ увеличение; ↓ — снижение; *P* — уровень значимости; для табл. 3, 4.

Таблица 4. Лейкоцитарный состав селезенки байкальского омуля (*Coregonus migratorius*) зараженных и незараженных *Dibothriocephallus dendriticus* ($M \pm mx$)

Показатель, %	Незараженные рыбы		Зараженные рыбы	<i>P</i>
Бластные клетки	13.3 ± 2.70	12.0 ± 2.23	—	0.58
Нейтрофилы	12.1 ± 1.68	4.9 ± 1.17	↓	0.001
Миелоциты	4.1 ± 0.85	1.4 ± 0.45	↓	0.009
Метамиелоциты	5.5 ± 1.1	2.5 ± 0.79	↓	0.03
Палочкоядерные	0.8 ± 0.29	0.3 ± 0.22	—	0.22
Сегментоядерные	1.7 ± 0.71	0.8 ± 0.35	—	0.29
Лимфоциты	74.6 ± 2.10	82.9 ± 2.32	↓	0.01
Пролимфоциты	56.5 ± 2.95	73.8 ± 2.52	↓	0.00007
Лимфоциты	18.1 ± 2.49	9.1 ± 1.63	↓	0.005

Fazio *et al.*, 2019), метод световой микроскопии остается достаточно информативным при изучении субпопуляций лейкоцитов рыб. Следует отметить, что лейкоцитарные реакции в ответ на антигенный стимул, в том числе паразитарный, характеризуются достаточно высокой чувствительностью (Головина, Тромбицкий, 1989; Серпунин, 2002; Buchmann, 2022). Определенные иммунные клетки реагируют на воспалительные сигналы и мигрируют к очагам

поражения, тогда как другие циркулируют через кровь от первичных иммунных органов к вторичным лимфоидным тканям, выполняя адаптивный иммунный ответ (Nie, Hoole, 2000; Nakanishi *et al.*, 2018; Buchmann, 2022). Исследования на клеточном уровне позволяют выявить адаптивные и компенсаторные изменения иммунных процессов даже в тех случаях, когда клетки морфологически не изменяются (Furtado *et al.*, 2019; Нгуен и др., 2021).

Цестоды оказывают иммуномодулирующее воздействие на организм хозяина для достижения компромисса в паразитарной системе (Sitjà-Bobadilla, 2008; McSorley *et al.*, 2013). В ходе эволюции *D. dendriticus* выработал стратегию роста и развития в своем хозяине. В организме плероцеркоиды мигрируют, а затем инкапсулируются в желудочно-кишечном тракте, что обеспечивает их выживание (Dezfuli *et al.*, 2007). Капсула физиологически активна, она способствует интенсивному транспорту питательных веществ из крови хозяина к паразиту (Березанцев и др., 1989; Sharp *et al.*, 1992). Физиологическую активность капсулы поддерживают биологически активные вещества, выделяемые паразитом в виде экзометаболитов (Березанцев и др., 1989). Вместе с тем, определенную роль в регуляции патологического процесса играют иммунные механизмы организма хозяина, подавляя рост паразитов или элиминируя их.

Байкальский омуль является промежуточным хозяином *D. dendriticus*, плероцеркоиды которого оказывают патогенное действие во время миграции и инкапсуляции (Пронина, Пронин, 1988). Авторы наблюдали кровоизлияния в мышечную оболочку желудка, эрозии и язвы в слизистой оболочке желудка, местные иммунные реакции (лейкоцитарную инфильтрацию серозной оболочки желудка и оболочек пищевода). А.С. Фоминой и С.В. Прониной (2015) выявлено в селезенке, зараженных *D. dendriticus* рыб, значительное снижение площади и числа меланомacroфагальных центров, склероз стенок сосудов и их облитерацию. В целом, работ по изучению системного иммунитета байкальского омуля в ответ на естественное заражение *D. dendriticus* единично.

В отличие от почек млекопитающих, почки рыб являются основным органом иммуно- и гемопоэза (Nakanishi *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2019). Пронефрос (головная почка) — орган, продуцирующий преимущественно иммунокомпетентные клетки, тогда как мезонефрос (туловищная почка) — многофункциональный орган, участвующий как в кроветворении, так и в мочеобразовании (Флерова, 2012). Селезенка является вторичным лимфоидным органом и местом миелопоэза у костистых рыб (Alvarez-Pellitero, 2008; Flajnik, 2018). Эти выводы согласуются с нашими результатами. У всех исследуемых особей про- и мезонефрос имел одинаковый лимфоидно-миелоидный состав с явным преобладанием лимфоцитов. Лейкоциты селезенки у омуля были представлены бластами, лимфоцитами и нейтрофилами, проходящими все стадии гранулоцитопоэза.

Лейкоцитарный состав пронефроса *C. migratorius*, зараженных *D. dendriticus* характеризовался более высоким числом нейтрофилов и нейтрофильных метамиелоцитов. В наших предыдущих исследованиях в крови байкальского омуля, зараженного *D. dendriticus* было выявлено аналогичное увеличение процента метамиелоцитов (Мазур, Толочко, 2015).

По-видимому, инфильтрация пронефроса незрелыми нейтрофилами и увеличение числа нейтрофилов в крови являются компенсаторной реакцией, связанной с миграцией этих микрофагов к месту воспаления и капсулообразования. Нейтрофилы являются первыми клетками, которые мигрируют к развивающимся плероцеркоидам *D. dendriticus* (Sharp *et al.*, 1992; Dezfuli *et al.*, 2016). Эти клетки, наделенные эффекторными функциями фагоцитоза и элиминации чужеродных элементов и обладающие способностью продуцировать иммуnoreгуляторные цитокины и хемокины, являются важнейшими компонентами врожденного иммунитета (Male *et al.*, 2006; Zou, Secombes, 2016; Makeish *et al.*, 2022).

Наши данные, согласуются с результатами других исследований (Furtado *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2019; Buchmann, 2022), демонстрирующие активную миграцию гранулоцитов к очагу воспаления, индуцированную червями разных классов. Во внутренних органах лососевых рыб, зараженных диффилоботриумами, было обнаружено хроническое воспаление с признаками фиброза, инфильтрацию тканей гранулоцитами, в том числе нейтрофилами (Sharp *et al.*, 1989; Dezfuli *et al.*, 2007; Santoro *et al.*, 2013). Исследования Е.М. Скоробреховой и В.П. Никишина (2013) показали, что активное участие нейтрофилов в инкапсуляции, например, *Corynosoma strumosum*, сохраняется даже в образовавшихся капсулах. Изучая микроморфологические изменения органов зараженного байкальского омуля, С.В. Пронина и Н.М. Пронин (1988) наблюдали наличие нейтрофилов и базофилов в стенках паразитарных капсул, а также гранулоцитарную инфильтрацию окружающей их ткани. Также в селезенке мы обнаружили более низкое общее число нейтрофилов и их незрелых форм — нейтрофильных миелоцитов и метамиелоцитов. Поэтому на основании полученных результатов мы предполагаем, что нейтропения явилась результатом обширного перемещения нейтрофилов из селезенки в кровотоки и к месту образования капсул и поврежденных тканей, и свидетельствовало о воспалительных процессах.

Также мы исследовали лимфоцитарный состав пронефроса и селезенки зараженного омуля с целью определить участие этих клеток в иммунном ответе против *D. dendriticus*. Лимфоциты, основные эффекторные клетки иммунной системы, инициируют начало адаптивного иммунного ответа на стимуляцию антигеном. Образование лимфоцитов в иммунных органах и их циркуляция в кровотоке происходят последовательно и связаны с функциями разных клеточных популяций. Лимфоциты подразделяются на Т- и В-клетки на основании наличия поверхностных рецепторов (Zarata *et al.*, 2006; García-Ayala, Chaves-Pozo, 2009). У рыб Т-клетки дифференцируются на субпопуляции, которые проявляют цитотоксическую и хелперную

активность и опосредуют клеточный иммунный ответ (Flajnik, 2018; Nakanishi *et al.*, 2018). Кроме того, эти клетки производят цитокины, участвующие в воспалительных процессах и реакциях при иммуносупрессии (Zou, Secombes, 2016). Между тем, В-клетки участвуют в гуморальном иммунном ответе, в основном продуцируемые пронефросом (Rombout, 2005). Экспрессия и секреция иммуноглобулинов (антител) плазматическими клетками (позднедифференцированные В-лимфоциты) имеют решающее значение для разрушения антигенов (Male *et al.*, 2006). Считается, что в селезенке присутствуют как Т-, так и В-лимфоциты (Zapata *et al.*, 2006; Kum, Sekkin, 2011).

В нашем исследовании *D. dendriticus* запускал иммунорегуляторные процессы, о чем свидетельствовало снижение общего количества лимфоцитов и пролимфоцитов (В-клеток) в пронефросе и увеличение пролимфоцитов в селезенке зараженных рыб. Эти данные позволяют предположить миграцию лимфоцитов в селезенку зараженных рыб, которая является основным местом презентации антигена и запуска адаптивного иммунного ответа (Flajnik, 2018). Увеличение лимфоидной ткани селезенки после антигенной стимуляции было показано и другими исследованиями (Noga, 2006; Kum, Sekkin 2011). У зараженного *D. dendriticus* омуля при гистологическом исследовании селезенки обнаружено увеличение зон скопления лимфоидной ткани вокруг мелано-макрофагальных центров (Фомина, Пронина, 2015), вместе с тем Тыхеев и др. (Тыхеев и др., 2020) обнаружили обеднение периапериартериальной (Т-зоны) этого органа. В селезенке у зараженного омуля, несмотря на индукцию лимфопролиферативного ответа, мы наблюдали низкое число зрелых лимфоцитов.

Следует отметить, что в литературе мало данных о влиянии капсулированных цестод на клеточный состав иммунных органов, что затрудняет обсуждение результатов. Тем не менее, наблюдаемые изменения мы связываем как с миграцией иммунных клеток, так и с иммуносупрессией вследствие регуляторного влияния цестоды. В наших предыдущих исследованиях мы показали, что в крови омуля, зараженного *D. dendriticus*, снижается содержание общего иммуноглобулина и количество Т-лимфоцитов (Мазур, Толочко, 2015). Более того, в экспериментальных условиях было обнаружено, что *D. dendriticus* способен секретировать простагландин E2 в ответ на инкубацию в культуральной среде, содержащей сыворотку крови хозяина (омуля) (Бисерова и др., 2011; Кутырев и др., 2012). Известно, что простагландины модулируют иммунитет, воздействуя на ключевые клеточные элементы (Gómez-Abellán, Sepulcre, 2016). В условиях *in vitro* простагландин E2 вызывал снижение общего числа лейкоцитов и лимфоцитов в культуре клеток пронефроса трехиглой колюшки (Кутырев и др., 2012). Кроме того, в транскриптом

D. dendriticus обнаружены гены, кодирующие потенциальные регуляторы иммунной системы хозяина (Sidorova *et al.*, 2022). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что *D. dendriticus* вызывает изменения иммунного статуса пронефроса и селезенки и, вероятно, подавляет адаптивный иммунитет в условиях живого организма. Кроме того, часть зрелых лимфоцитов, очевидно, мигрирует в места поражений, вызванных паразитами. Например, имеются гистологические данные о том, что лимфоциты присутствуют во внешнем слое капсул дифиллоботриид в пищеводе и желудке *C. migratorius* (Пронина, Пронин, 1988), в тканевых капсулах *Salmo gairdneri*, инфицированных *D. dendriticus* (Sharp *et al.*, 1989), а также у атлантического лосося после заражения *Diphylllobothrium ditremus* (Rodger, 1991).

Следует отметить, что иммуноактивные элементы, такие как моноциты/макрофаги, базофилы и эозинофилы исследуемого нами омуля, практически не участвовали в иммунном процессе. В то же время имеются данные об инфильтрации этими иммунореактивными клетками тканей органов локализации *D. dendriticus* (оболочек желудка и пищевода) и мембран окружающих их капсул (Пронина, Пронин, 1988; Dezfūli *et al.*, 2007). А.С. Фомина и С.В. Пронина (2015) делают вывод об угнетении моноцитарно-макрофагального звена иммунной защиты омуля при этом дифиллоботриозе. Поэтому низкое число или отсутствие этих популяций лейкоцитов в иммунных органах исследуемого омуля, зараженного *D. dendriticus*, мы объясняем миграцией к очагам воспаления. Более того, не исключено, что этот факт связан с паразитарными манипуляциями, регулирующими межклеточные взаимодействия и направленными на подавление пролиферации этих эффекторных лейкоцитов, о чем говорилось выше. Известно, что базофилы/тучные клетки и эозинофилы пролиферируют в ответ на действие продуктов Т-клеток по уничтожению гельминтов (Meeusen, Balic 2000; Peng *et al.*, 2022).

Лейкоцитарный состав мезонефроса у омуля, зараженного *D. dendriticus*, значимо не изменился, вероятно, этот орган не играет существенной роли в иммунных защитных реакциях против дифиллоботриид.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые представлен анализ лейкоцитарного состава почек (пронефрос, мезонефрос) и селезенки, иммунных и гемопоэтических органов байкальского омуля *C. migratorius*, зараженных *D. dendriticus* в естественных условиях среды обитания. В пронефросе зараженных рыб, число недифференцированных нейтрофилов (миелоцитов и метамиелоцитов) было значимо выше, чем у незараженных особей, что указывало на развитие

воспалительных процессов. В организме зараженных рыб *D. dendriticus* инициировал иммунорегуляторные процессы, о чем свидетельствовало снижение общего числа лимфоцитов и пролимфоцитов (В-лимфоцитов) в пронефросе и увеличение пролимфоцитов в селезенке на фоне снижения их зрелых форм. Другие эффекторные элементы (клетки моноцитарно-макрофагальной линии, базофилы и эозинофилы) не участвовали в противопаразитарной защите. На основании обсуждаемых сейчас и ранее полученных нами данных можно заключить, что заражение *D. dendriticus* вызывает изменения врожденных и адаптивных иммунных реакций в организме хозяина. Благодаря этой стратегии плероцеркоиды инкапсулируются и предотвращают чрезмерное разрушение тканей организма хозяина, тем самым динамично сохраняя паразитарную систему.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В. Матанцеву (Большереченский рыболовный завод, Бурятия) и А.В. Базову (Российский федеральный научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Байкальский филиал) за помощь в отлове омуля, Н. Пронину† и С. Прониной†, Т. Бурдуковской, О. Жепхоловой (ФГУН ИОЭБ СО РАН) за помощь в проведении паразитологического вскрытия рыб.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, способствующие этой работе, соответствуют этическим стандартам соответствующих национальных и институциональных руководств по уходу и использованию животных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при поддержке и в рамках задания Правительства РФ (Госрегистрация № 121030900141-8).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бауэр О.Н. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР: Паразитические простейшие. Т. 1. Ленинград: Наука, 1984. 428 с.

Бауэр О.Н. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР: Паразитические многоклеточные. Т. 2. Ленинград: Наука, 1985. 425 с.

Бауэр О.Н. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР: Паразитические многоклеточные. Т. 3. Ленинград: Наука, 1987. 587 с.

Базов А.В., Базова Н.В. Селенгинская популяция байкальского омуля: прошлое, настоящее, будущее. Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2016. 352 с.

Березанцев Ю.А., Борщук Д.В., Оксов И.В. и др. Инкапсуляция личинок паразитических нематод и цестод в тканях позвоночных как форма взаимоотношения паразита и хозяина // Паразитол. сб. ЗИН АН СССР. 1989. № 36. С. 131–160.

Бисерова Н.М., Кутырев И.А., Малахов В.В. Ленточный червь продуцирует простагландин Е2 – регулятор иммунитета хозяина // Докл. РАН. 2011. Т. 441. № 1. С. 126–128.

Головина Н.А., Стрелков Ю.А., Воронин В.И., Головин П.П., Евдокимова Е.Б., Юхименко Л.Н. Ихтиопатология. Москва: Мир, 2003. 448 с.

Головина Н.А., Тромбицкий И.Д. Гематология прудовых рыб. Кишинев: Штиинца, 1989. 158 с.

Делямуре С.Л., Скрябин А.С., Сердюков А.М. Дифиллоботрииды ленточные гельминты человека, млекопитающих и птиц // Основы цестодологии. Т. XI. М.: Наука, 1985. 200 с.

Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб (сравнительная морфология и классификация форменных элементов крови рыб). Москва: Легк. и пищ. пром-сть, 1983. 80 с.

Куклина М.М., Куклин В.В. Гематология и биохимия крови серебристой чайки *Larus argentatus* при инвазии цестодами *Diphyllbothrium dendriticum* (Cestoda: Pseudophyllidae) // Паразитология. 2016. Т. 50. № 5. С. 365.

Кутырев И.А., Бисерова Н.М., Шарсак Й.П., Курц Й. Простагландин Е2 как потенциальный иммуномодулятор лентеца чаечного // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2012. № 5(87). С. 245–249.

Лапирова Т.Б., Флерова Е.А., Юрченко В.В., Морозов А.А. Защитные системы иммунокомпетентных органов рыб разных экологических и систематических групп // Ихтиология. 2017. Т. 57. №3. С. 338–346. <https://doi.org/10.1134/S0032945217030080> (Lapirova T.B., Flerova E.A., Yurchenko V.V., Morozov, A.A. Protective systems of immunocompetent organs in fishes from different ecological and systematic groups // J. Ichthyology. 2017. № 57. 458–466. <https://doi.org/10.1134/S0032945217030080>

Мазур О.Е., Толочко Л.В. Цитоморфологические и биохимические показатели байкальского омуля *Coregonus migratorius* при инвазии плероцеркоидами *Diphyllbothrium dendriticum* (Cestoda: Pseudophyllidae) // Изв. РАН. Сер. биологическая. 2015. № 2. С. 155–163. <https://doi.org/10.7868/S000233291502006X> (Mazur, O.E. and L.V. Tolochko. Cytomorphological and biochemical characteristics

- of the whitefish, Baikal Omul *Coregonus migratorius*, infected by plerocercoids of *Diphyllbothrium dendriticum* (Cestoda: Pseudophyllidae). Biological Bulletin. 2015. V. 42. № 2. 117–123.
<https://doi.org/10.1134/S1062359015020065>)
- Нгуен Т.Х.В., Пономарев С.В., Федоровых Ю.В., Грозе-ску Ю.Н., Бахарева А.А., Волкова И.В., Егорова В.И., Сергеева Ю.В. Гематологические показатели европейского окуня (*Perca fluviatilis* Linneus, 1758) при паразитарной инвазии // Сельскохозяйственная биология. 2021. Т. 56. № 2. С. 326–334. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.2.326rus> (Nguyen Thi Hong Van, Ponomarev S.V., Fedorovych Yu.V., Grozesku Yu.N., Bakhareva A.A., Volkova I.V., Egorova V.I., Sergeeva Yu.V. Agricultural Biology. 2021. V. 56, № 2. 326–334. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.2.326>)
- Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. М.: Пищ. пром-сть, 1966. 75 с.
- Пронина, С.В., Пронин Н.М. Взаимоотношения в системах гельминты-рыбы (на тканевом, органном и организменном уровнях) М.: Наука, 1988. 177 с.
- Пронин Н.М., Пронина С.В., Кутырев И.А. Структура Байкальского природного очага дифиллоботриоза и взаимоотношения *Diphyllbothrium dendriticum* с дефинитивными хозяевами // Изв. ИГУ. Сер. Биология. Экология. 2009. Т. 2. № 1. С. 53–56.
- Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб. Ч. 2. Москва: Агро-Вестник, 1999. 236 с.
- Серпунин Г.Г. Гематологические показатели адаптаций рыб: Автореф. дис. докт. биол. наук. Калининград: КГТУ, 2002. 49 с.
- Скоробрехова Е.М., Никишин В.П. Зависимость строения капсулы, окружающей скребня *Corynosoma strumosum*, от видовой принадлежности естественного паратенического хозяина // Изв. РАН. Сер. биол. 2013. № 6. С. 696–712. (Skorobrechova E.M. and V. P. Nikishin. Dependence of the structure of the capsule surrounding the acanthocephalan *Corynosoma strumosum* on the species of its natural paratenic host. Biological Bulletin. 2014. V. 41. № 4. 333–348. <https://doi.org/10.1134/S1062359013050166>)
- Тыхеев А.А., Жамсаранова С.Д., Лебедева С.Н., Кутырев И.А., Томитова Е.А., Петерфельд В.А., Путункеева Ю.С., Игнатьева М.В. Морфологические изменения структуры селезенки нерестового омуля, зараженного *D. dendriticum* // Вестник КрасГАУ. 2020. №6 (159). С. 116–124.
<https://doi.org/10.36718/1819-4036-2020-6-116-125>
- Флерова Е.А. Клеточная организация почек костистых рыб (на примере отрядов *Cypriniformes* и *Perciformes*). Ярославль: Ярославская ГСХА, 2012. 140 с.
- Фомина А.С., Пронина С.В. Морфофункциональные характеристики селезенки байкальского омуля при заражении cestодой *D. dendriticum* (Pseudophyllidae Diphyllbothriidae) // Вест. рыбохозяйственной науки. 2015. Т. 2 №1 (5). С. 52–57.
- Чугунова Н.И. Руководство по изучению возраста и роста рыбы. Москва: Акад. Наук СССР, 1959. 164 с.
- Alvarez-Pellitero P. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects // Vet. Immunol. Immunopathology. 2008. № 126. P. 171–198.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.07.013>
- Buchmann K. Neutrophils and aquatic pathogens // Parasite immunol. 2022. № 44. P. 12915.
<https://doi.org/10.1111/pim.12915>
- Bush A. O., Lafferty K. D., Lotz J. M., Shostak A. W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited // J. Parasitology. 1997. V. 83. № 4. P. 575–583. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01233.x>
- Dezfuli B.S., Bosi G., De Pasquale J.A., Manera M., Giari L. Fish innate immunity against intestinal helminths // Fish Shellfish Immunol. 2016. № 50. P. 274–287. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.02.002>
- Dezfuli B.S., Pironi F., Simoni E., Shinn A.P., Giari L. Selected pathological, immunohistochemical and ultrastructural changes associated with an infection by *Diphyllbothrium dendriticum* (Nitzsch, 1824) (Cestoda) plerocercoids in *Coregonus lavaretus* (L.) (Coregonidae) // Dis. Aquat. Org. 2007. № 30. P. 471–482.
- Fazio F., Saoca C., Costa G., Zumbo A., Piccione G., Parrino V. Flow cytometry and automatic blood cell analysis in striped bass *Morone saxatilis* (Walbaum, 1792): a new hematological approach // Aquaculture. 2019. № 513. P. 734398.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734398>
- Flajnik M.F. A cold-blooded view of adaptive immunity // Nature Reviews Immunol. 2018. V. 18. № 7. C. 438–453. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0003-9>
- Franke F., Rahn A.K., Dittmar J., Erin N., Rieger J.K., Haase D., Samonte-Padilla I.E., Lange J., Jakobsen P.J., Hermida M., Fernandez C., Kurtz J., Bakker T.C.M., Reusch T.B.H., Kalbe M., Scharsack J.P. In vitro leukocyte response of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) to helminth parasite antigens // Fish Shellfish Immunol. 2014. № 36. P. 130–140.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.019>
- Furtado W.E., Cardoso L., Figueredo A.B., Marchiori N.C., Martins M.L. Histological and hematological alterations of silver catfish *Rhamdia quelen* highly parasitized by *Lernaea cyprinacea* // Dis. Aquat. Org. 2019. № 135. P. 157–168.
<https://doi.org/10.3354/dao03386>
- García-Ayala A., Chaves-Pozo E. Leukocytes and cytokines present in fish testis: A review // Fish Defenses. Immunology. Chapter 2 / Eds Zaccane G., Meseguer J., García-Ayala A., Kapoor B.G.; New Hampshire: Science Publishers. Enfield USA, 2009. P. 37–74.
- Gómez-Abellán V., Sepulcre M.P. The role of prostaglandins in the regulation of fish immunity // Mol. Immunol. 2016. № 69. P. 139–145.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.09.022>
- Hoffman G.L., Dunbar C.E. Mortality of eastern brook trout caused by plerocercoids (Cestoda: Pseudophyllidae) in the heart and viscera // J. Parasitology. 1961. № 47. P. 399–400.

- Inoue T., Moritomo T., Tamura Y., Mamiya S., Fujino H., Nakanishi T. A new method for fish leukocyte counting and partial differentiation by flow cytometry // *Fish Shellfish Immunol.* 2002. № 13. P. 379–390.
<https://doi.org/10.1006/fsim.2002.0413>.
- Knopf K., Madriles H.A., Lucius R., Bleiss W., Taraschewski H. Migratory response of European eel (*Anguilla anguilla*) phagocytes to the eel swimbladder nematode *Anguillicola crassus* // *Parasitol. Res.* 2008. № 102. P. 1311–1316.
<https://doi.org/10.1007/s00436-008-0910-y>
- Kobayashi I., Katakura F., Moritomo T. Isolation and characterization of hematopoietic stem cells in teleost fish // *Dev. Comp. Immunol.* 2016. № 58. P. 86–94.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.01.003>
- Kum C., Sekkin S. The immune system drugs in fish: immune function, immunoassay, drugs // *Recent advances in fish farms* / Eds Aral F., Dogu Z.; Rijeka: Croatia. Tech, 2011. P. 169–216.
- Kutyrev I.A., Biserova N.M., Olennikov D.N., Korneva J.V., Mazur O.E. Prostaglandins E2 and D2 – regulators of host immunity in the model parasite *Diphyllbothrium dendriticum*: An immunocytochemical and biochemical study // *Mol. Bioch. Parasitology.* 2017. № 212. P. 33–45.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2017.01.006>
- Kutyrev I.A., Franke F., Buescher J., Kurtz J., Scharsack J.P. In vitro effects of prostaglandin E-2 on leucocytes from sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) infected and not infected with the cestode *Schistocephalus solidus* // *Fish Shellfish Immunol.* 2014. № 41. P. 473–481.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.09.031>
- Makesh M., Bedekar K.M., Rajendran K.V. Overview of fish immune system // *Fish immune system and vaccines* / Eds Makesh M., Rajendran K.V.; Singapore: Springer, 2022. P. 1–16.
https://doi.org/10.1007/978-981-19-1268-9_1
- Male D.L., Brostoff J., Roth D., Roitt I. Immunology. 7th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2006. 552 p.
- McSorley H.J., Hewitson J.P., Maizels R.M. Immunomodulation by helminth parasites: defining mechanisms and mediators // *Int. J. Parasitology.* 2013. № 43. P. 301–310.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.11.011>
- Meeusen E.N.T., Balic A. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? // *Parasitology Today.* 2000. № 16. P. 95–101.
[https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01607-5](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01607-5)
- Nakanishi T., Hikima J.-I., Yada T. Osteichthyes: immune systems of teleosts (Actinopterygii) // *Advances in comparative immunology* / Ed. Cooper E.L.; Cham: Springer, 2018. P. 687–749.
- Nie P., Hoole D. Effects of *Bothriocephalus acheilognathi* on the polarization response of pronephric leucocytes of carp, *Cyprinus carpio* // *J. Helminthology.* 2000. № 4. P. 253–260.
<https://doi.org/10.1017/S0022149X00000366>
- Noga E.J. Spleen, thymus, reticulo-endothelial system, blood // *Systemic pathology of fish. A text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease* / Ed. Ferguson H.W.; London: Scotian Press, 2006. P. 121–139.
- Parrino V., Cappello T., Costa G., Cannavà C., Sanfilippo M., Fazio F., Fasulo S. Comparative study of haematology of two teleost fish (*Mugil cephalus* and *Carassius auratus*) from different environments and feeding habits // *Europ. Zoological J.* 2018. № 85. P. 194–200.
<https://doi.org/10.1080/24750263.2018.1460694>.
- Peng J., Federman H.G., Hernandez C.M., Siracusa M.C. Communication is key: Innate immune cells regulate host protection to helminths // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. 995432.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.995432>
- Rahkonen R., Aalto J., Koski P., Sarkka J., Juntunen K. Cestode larvae, *Diphyllbothrium dendriticum* (Nitzsch, 1824), as a cause of heart disease leading to mortality in hatchery reared sea trout and brown trout // *Dis. Aquat. Org.* 1996. № 25. P. 15–22.
<https://doi.org/10.3354/dao025015>
- Rodger H.D. *Diphyllbothrium* sp. infections in freshwater-reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) // *Aquaculture.* 1991. №95(1–2). P. 7–14.
- Rombout J.H.W.M., Huttenhuis H.B.T., Picchiotti S. Phylogeny and ontogeny of fish leukocytes // *Fish Shellfish Immunol.* 2005. № 19. P. 441–455.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.007>
- Santoro M., Mattiucci S., Work T., Cimmaruta R., Nardi V., Cipriani P., Bellisario B., Nascetti G. Parasitic infection by larval helminthes in Antarctic fishes: pathological changes and impact on the host body condition index // *Dis. Aquat. Org.* 2013. № 105(2). P. 139–148.
<https://doi.org/10.3354/dao02626>
- Scharsack J.P., Kalbe M., Derner R., Kurtz J., Milinski M. Modulation of granulocyte responses in three-spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* infected with the tapeworm *Schistocephalus solidus* // *Dis. Aquat. Org.* 2004. № 59. P. 141–150.
<https://doi.org/10.3354/dao059141>
- Scholz T., Kuchta R. Fish-borne, zoonotic cestodes (*Diphyllbothrium* and relatives) in cold climates: A never-ending story of neglected and (re)-emergent parasites // *Food Waterborne Parasitol.* 2016. № 4. P. 23–38.
<https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2016.07.002>
- Scholz T., Kuchta R., Oros M. Tapeworms as pathogens of fish: A review. *J. Fish Diseases.* 2021. № 44. P. 1883–1990.
<https://doi.org/10.1111/jfd.13526>
- Sidorova T.V., Khabudaev K.V., Sukhanova L.V., Zheng Y., Dugarov Zh.N., Mazur O.E. Comparative transcriptomic analysis of the larval and adult stages of *Dibothriocephalus dendriticus* (Cestoda: Diphyllbothriidae) // *Parasitology Research.* 2022. № 122. P. 145–156.
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1819849/v1>
- Sharp G.J.E., Pike, A.W., Secombes C.J. The immune response of wild rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to naturally acquired plerocercoid infections of *Diphyllbothrium dendriticum* (Nitzsch, 1824) and

- Diphyllbothrium ditremum* (Creplin, 1825) // J. Fish Biology. 1989. № 35. P. 781–793.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1989.tb03029.x>
- Sharp G.J.E., Pike A.W., Secombes C.J. Sequential development of the immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)) to experimental plerocercoid infections of *Diphyllbothrium dendriticum* (Nitzsch, 1824) // Parasitology. 1992. № 104. P. 169–178.
- Sitjà-Bobadilla A. Living off a fish: a trade-off between parasites and the immune system // Fish Shellfish Immunol. 2008. № 25. P. 358–372.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.018>
- Souza D.C.M., Santos M.C., Chagas E.C. Immune response of teleost fish to helminth parasite infection // Brazilian J. Vet. Parasitology. 2019. № 28(4). P. 533–547.
<https://doi.org/10.1590/S1984-29612019080>
- Stosik M., Tokarz-Deptula B., Deptula W. Immunological memory in teleost fish // Fish Shellfish Immunol. 2021. № 115(2021). P. 95–103.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.05.022>
- Teterina V., Sukhanova L., Smirnov V., Smirnova N., Kirilchik S., Sapozhnikova Y., Glizina O., Yakhnenko V., Tyagun M., Sidorova T. Complete mitochondrial genomes of Baikal endemic coregonids: omul and lacustrine whitefish (Salmonidae: *Coregonus* sp.) // Mitochondrial DNA Part B. 2020. № 5(1). P. 414–416.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1703565>
- Torres V., Leyan P., Puga S. Prevalence, intensity, and abundance of infection and pathogenesis caused by diphyllbothriosis in vulnerable, native fish and introduced trout in Lake Panguipulli, Chile // J. Wild Life Dis. 2012. № 48(4). P. 937–950.
<https://doi.org/10.7589/2011-08-235>
- Zapata A., Diez B., Cejalvo T., Gutierrez-De Frias C., Cortes A. Ontogeny of the immune system of fish // Fish and Shellfish Immunol. 2006. № 20. P. 126–136.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.005>
- Zou J., Secombes C.J. The function of fish cytokines. Biology. 2016. № 5(2). P. 1–23.
<https://doi.org/10.3390/biology5020023>

Leukocyte composition of immune organs of *Coregonus migratorius*, infected *Dibothriocephalus dendriticus*

© 2023 O. E. Mazur*, I. A. Kuttyrev, L. V. Tolochko

Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, 670047 Russia
 *E-mail: olmaz33@yandex.ru

For the first time, an analysis of leukocyte changes in the immune organs (pronephros, mesonephros and spleen) of the Baikal omul *Coregonus migratorius* (Georgi, 1775) (Salmoniformes: Coregonidae) infected with *Dibothriocephalus dendriticus* (Nitsch, 1824) (syn. *Diphyllbothrium dendriticum*) (Cestoda: Diphyllbothriidea) is presented in natural habitat conditions. In the pronephros of infected fish, the number of poorly differentiated neutrophils (myelocytes and metamyelocytes) was significantly higher than in uninfected fish, which indicated inflammatory processes. *D. dendriticus* triggered the immunoregulatory processes in the body of infected fish, as evidenced by the decrease in the total number of lymphocytes and prolymphocytes (B-lymphocytes) in the pronephros and the increase in prolymphocytes in the spleen. The other effector elements (cells of the monocyte-macrophage lineage, basophils and eosinophils) were hardly involved in antiparasitic defense.

Keywords: Coregonidae, Baikal omul, kidney, spleen, immune response, Diphyllbothriidea

УДК 575.17: 599.73

АВТОМАТИЗИРОВАННОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ И ПОДСЧЕТ САЙГАКОВ (*SAIGA TATARICA*) НА СВЕРХДЕТАЛЬНЫХ СПУТНИКОВЫХ ИЗОБРАЖЕНИЯХ С ПОМОЩЬЮ ГЛУБОКИХ КОНВОЛЮЦИОННЫХ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ

© 2024 г. В. В. Рожнов*,[@], А. Л. Сальман**, А. А. Ячменникова*,
А. А. Лушекина*, П. А. Сальман**

*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук,
Ленинский проспект, 33, Москва, 119071 Россия

**ООО «ЭС-ПАС», Ленинградское ш., 15, Москва, 125171 Россия

[@]E-mail: rozhnov-v-2015@yandex.ru

Поступила 02.05.2024 г.

После доработки 03.05.2024 г.

Принята к печати 03.05.2024 г.

Разработана технология автоматизированного выявления и подсчета сайгаков (*Saiga tatarica*) на спутниковых снимках с разрешением 0.3–0.5 м/пиксель (спутники Eros-B 2012; 2013 и Beijing KA 2022) посредством использования двухфазного анализа с помощью глубоких конволюционных нейронных сетей (ГКНС). Сначала путем автоматического разбиения спутникового изображения на участки проверяется наличие/отсутствие скоплений объектов (фаза «классификации»), затем анализируются только те фрагменты спутникового изображения, где был обнаружен хотя бы один сайгак (фаза «выявления»). Метод калибровался посредством обучения нейронной сети на основе результатов предварительной обработки архивных спутниковых изображений 2012 и 2013 гг., проведенной экспертами-зоологами вручную. При тестировании работы ГКНС с «порогом уверенности» в 0.3 на всем модельном спутниковом изображении было выявлено 1 284 сайгака, тогда как экспертом-зоологом вручную 1 412 сайгаков. Для практического использования и оценки эффективности данного метода был проведен подсчет сайгаков на снимке 2022 г., охватывающем две смежные особо охраняемые природные территории (ООПТ), расположенные в Республике Калмыкия и Астраханской области, позволивший представить результаты с разным «порогом уверенности».

Ключевые слова: оценка численности, сайгак, *Saiga tatarica*, ДДЗЗ, нейронные сети, ГКНС, ИИ, подсчет животных, автоматизированные неинвазивные методы

DOI: 10.31857/S1026347024050073, **EDN:** ulfezi

Оценка численности и пространственного распределения вида — один из ключевых аспектов мониторинга объектов животного мира, т.е. системы регулярных наблюдений и сбора данных о популяциях, населяющих определенные территории, и их среде обитания. Такие данные необходимы как для своевременного выявления происходящих в популяции изменений, так и для формирования научно-обоснованной системы мер по сохранению видов, особенно занесенных в Красную книгу Российской Федерации, а также для разработки мероприятий по сохранению экосистем в целом. В этом плане экологический мониторинг, позволяющий собирать широкий спектр информации о видах, в том числе учет численности животных, играет ключевую роль в сохранении

редких видов и рациональном использовании природных ресурсов (Prosekov, 2020).

Традиционно оценка численности животных обитателей открытых пространств и, в частности, степных экосистем, проводится с использованием автомобильных или авиационных средств — низколетящих небольших самолетов, вертолетов или беспилотных летательных аппаратов (Машкин, 2022). Однако эти методы оказывают крайне негативное воздействие на легко уязвимые экосистемы и на самих животных. Использование автомобилей нарушает степные экосистемы Северо-Западного Прикаспия, состояние которых уже сейчас нестабильно вследствие перевыпаса скота, особенно на фоне процессов глобального потепления (Неронов и др., 2013; Сапанов, 2018, 2021), а авиатехника

вызывает у животных паническое бегство (вплоть до гибели от изнеможения) и чрезмерно стрессует их. Кроме того, такие методы учета не позволяют одновременно охватить обширные площади, на которых обитают животные, и объективно оценить их численность вследствие значительного искажения результатов за счет перемещения и смещения животных во время учета, а также из-за несовершенства методов последующей обработки получаемых данных.

Таким образом, в настоящее время не существует сколь-нибудь удовлетворительной методики учета (оценки) численности копытных открытых пространств, позволяющей минимизировать как погрешность самого учета, так и одновременно исключить фактор беспокойства животных, возникающий во время проведения учетных работ. Результаты таких работ можно отнести только к категории «экспертных оценок».

В последнее время появляются новые дистанционные, инструментальные методы получения объективной информации о численности и состоянии популяций, о благополучии животных, а также о состоянии их местообитаний. Среди них альтернативным подходом к оценке численности животных в природной среде может стать использование данных дистанционного зондирования Земли (ДДЗЗ) — мультиспектральных спутниковых снимков высокого разрешения (0.3—0.5 м/пиксель). На таких снимках могут быть обнаружены объекты сравнительно небольших размеров, в категорию которых попадают многие виды млекопитающих (Рожнов и др., 2014, 2015; Платонов и др., 2011, 2013; Ячменникова и др., 2015), особенно обитатели открытых ландшафтов. Набор признаков самого животного, различимых на спутниковых снимках, не всегда достаточен для его распознавания. Это вызывает определенные сложности для решения поставленной задачи, в том числе и подсчета животных. В таких случаях требуется использовать дополнительную информацию о косвенных признаках, характерных для животных того или иного вида (особенности стадной организации — скопления, стада, группы и дистанции между ними; дистанции между животными в группах и их форма и т.п.). При этом выявление на спутниковых снимках мест расположения скоплений животных позволяет определить как реальную пространственную структуру популяции, так и оценить ее численность. До недавнего времени процесс распознавания животных на снимках осуществляли эксперты-зоологи и только вручную (Рожнов и др., 2014; Ячменникова и др., 2015). На это уходило до нескольких месяцев рутинной работы специалистов, превращая в ряде случаев полученные результаты в устаревшую и непригодную для оперативного решения задач охраны и рационального использования животного мира информацию.

В последние десятилетия наблюдается стремительное развитие технологий искусственного интеллекта (Fromm *et al.*, 2019), что позволяет внедрять их и для исследований состояния популяций копытных открытых пространств. Одна из многих отраслей искусственного интеллекта — машинное обучение. Оно представляет собой разработку алгоритмов и статистических моделей, которые компьютерные системы используют для выполнения сложных задач без четких инструкций, полагаясь на найденные ими закономерности в размеченных специалистом данных.

Компьютерные системы используют алгоритмы машинного обучения для обработки больших объемов данных путем обобщения их характерных признаков и выявления принципов и распределений в структуре данных, что позволяет решать такие задачи как распознавание образов, классификация и прогнозирование состояний объекта на основе моделей, которые в свою очередь были созданы (обучены) на базе существующих реальных данных.

При наличии больших объемов исходных размеченных данных появляется возможность «натренировать» модель на решение конкретной задачи с высокой точностью, что позволяет полностью автоматизировать многие процессы обработки данных, исключая необходимость участия в них человека (Tarca *et al.*, 2007). Это приводит к увеличению быстродействия и надежности работы систем, снижению финансовых затрат. При этом всегда остается возможность «дообучать» модель на новых наборах данных, что обеспечивает непрерывное улучшение качества ее функционирования.

Таким образом, с одной стороны, использование методов машинного обучения необходимо для сведения к минимуму вероятности влияния человеческого фактора на точность и производительность системы, с другой — создание модели и ее работа должны основываться на конкретных фактических данных.

В настоящее время создается все больше систем на базе технологий искусственного интеллекта, способных исключительно быстро в автоматическом режиме и с высокой точностью решать задачи, актуальные для зоологии и экологии, требовавшие ранее огромных временных затрат и привлечения обширной команды высококвалифицированных специалистов.

Для разработки актуальных технологий учета копытных открытых пространств модельным видом может быть сайгак. По инициативе Конвенции по сохранению мигрирующих видов диких животных (CMS) и Конвенции о международной торговле видами дикой фауны и флоры, находящимися под угрозой уничтожения (CITES), все страны-ареала сайгака подписали Меморандум

о взаимопонимании относительно сохранения, восстановления и устойчивого использования антилопы сайги. В соответствии с этим Меморандумом в нашей стране с 2009 г. также были начаты работы по улучшению охраны и восстановлению численности сайгака (Неронов и др., 2013). Однако до настоящего времени отсутствуют полноценные данные о реальном состоянии популяции сайгака Северо-Западного Прикаспия и не проведена оценка результативности принятых мер по его охране. Такие данные невозможно получить без правильно организованного учета животных и проверяемых, показанных со статистической достоверностью данных о численности популяции, ее половозрастном составе и пространственной структуре.

Имеющийся у нас задел в виде результатов ранее выполненных работ, подтвердивших возможность по определенному комплексу дешифровочных признаков распознавать на спутниковых изображениях сайгаков и их скопления, отличающиеся от других животных (Рожнов и др., 2014, 2015; Ячменникова и др., 2015), а также появление соответствующих ИТ-технологий, определили цель нашей работы — создание методики автоматизированного подсчета копытных открытых пространств на мультиспектральных спутниковых снимках высокого разрешения при использовании технологий искусственного интеллекта на примере сайгака.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для разработки методики учета копытных открытых пространств, основанной на использовании высокодетальной спутниковой съемки и технологии искусственного интеллекта в качестве модельного объекта нами выбран сайгак (*Saiga tatarica*) популяции Северо-Западного Прикаспия. Численность этих животных с 2004 г. находилась на стабильно низком уровне (Milner-Gulland *et al.*, 2001; Неронов и др., 2013; Каримова, Лушкина, 2018; Каримова и др., 2020, 2021, 2022). Этот вид занесен в Красную Книгу Российской Федерации (2021) и до недавнего времени находился в Красном списке Международного союза охраны природы и природных ресурсов (МСОП) в статусе «находящийся на грани исчезновения». Сайгак — один из двух видов антилоп, известных на территории России, его единственная самостоятельная популяция обитает в Северо-Западном Прикаспии — в восточных районах Республики Калмыкия и юго-западных районах Астраханской области. Это ключевой вид, определяющий благополучие аридных экосистем Евразии (в естественных условиях природного баланса).

Спутниковые изображения. Для выявления и учета таких животных, как сайгаки, используются

оптические данные сверхвысокого разрешения (не грубее 0.5 м/пиксель). На таком снимке каждое животное занимает более одного пикселя спутникового изображения. Однако с повышением пространственного разрешения спутникового изображения уменьшается его территориальный охват. Так, при съемке с разрешением 0.5 м/пиксель каждая полоса съемки имеет ширину не более 20 км (в зависимости от спутника, производящего съемку). Это означает, что для покрытия съемкой территории площадью, например 100×100 км, потребуется не менее пяти пролетов спутника, что не всегда возможно реализовать одновременно (в один день). Поскольку и метеорологические условия не всегда бывают оптимальными для получения качественных данных (наличие облачности, пониженная прозрачность воздуха вследствие тумана или пылевой приземной взвеси), а животные могут активно перемещаться, результаты такой работы будут их недоучет или переучет.

В этой связи важно производить съемку исследуемых территорий в периоды наиболее «стационарного поведения» животных, подлежащих учету. Для сайгаков это соответствует времени гона, который обычно приходится на холодный сезон года — с последней декады ноября по первую декаду января. Среднестатистическая метеорологическая обстановка для исследуемой местности также соответствует параметрам, подходящим для съемки необходимого качества. Долговременные метеопрогнозы позволяют запланировать съемку заранее и отснять территорию достаточно обширной площади одним днем.

Для разработки методики автоматической оценки численности сайгака с помощью искусственного интеллекта нами использован снимок, полученный 22.11.2012 г. со спутника Eros-B (ImageSat International, Израиль). Спутник формирует оптические данные в одном спектральном канале (панхроматический), с пространственным разрешением в надире 0.4–0.7 м/пиксель, динамическим диапазоном 10 бит/пиксель, шириной полосы съемки 7 км. Базовое спутниковое изображение, использованное как *модельное* для разработки метода (спутниковое изображение № 1), охватывает территорию площадью 7×32 км, расположенную на границе Астраханской области и Республики Калмыкия (рис. 1а), и состоит из 3 498 786 500 пикселей. Выявленные ранее на этом снимке экспертом-зоологом вручную животные (рис. 1б) были использованы для обучения нейронных сетей.

Для тестирования работы уже обученной сети использовали другое спутниковое изображение, полученное 12.01.2013 г. также со спутника Eros-B на эту же территорию — спутниковое изображение № 2.

По итогам работы для проверки практической эффективности разработки и проведения соответствующей оценки количества сайгаков

на модельной территории было использовано спутниковое изображение № 3 — снимки разрешением 0.45—0.7 м/пиксель, полученные 2.12.2022 г. со спутника КА Beijing (Twenty First Century Aerospace Technology), охватившие практически всю площадь смежных ООПТ — 1 600 км² (рис. 2).

Ручное дешифрирование спутниковых изображений и выявление сайгаков. Для выявления сайгаков вручную применяли принципы, изложенные нами ранее (Рожнов и др., 2014). Сначала эксперт-зоолог разбивает полученное спутниковое изображение на прямоугольники равной площади, отрисовывая сетку в векторном слое, а сами ячейки-прямоугольники нумерует. Такая схема разбивки позволяет упорядочить режим просмотра отснятой территории, так как обработка снимка обширной площади вручную занимает до нескольких недель. При последовательном просмотре выделенных ячеек все отмеченные скопления некрупных объектов обводятся вручную и также нумеруются. Для этого создается еще один векторный слой. После того, как весь снимок размечен таким образом, создаются новые векторные слои, на которых маркируются уже сами объекты, выявленные в скоплениях, проводится их анализ и проверка соответствия их признакам, характерным для групп сайгаков. Если объекты на снимке внутри того или иного полигона по комплексу дешифровочных признаков соответствуют сайгакам, они отмечаются точками в векторном слое под названием «сайгаки», все прочие объекты отмечаются в другом векторном слое, названном «не сайгаки». После того, как все объекты в скоплении размечены точками, производится их автоматизированный подсчет с помощью любой программы для работы с ГИС (нами использованы программы Scanex Image Processor, MapInfo и Q-GIS). Таким образом, предложенные экспертом-зоологом последовательность действий и этапы операций были использованы для разработки схемы обучения нейронной сети, что определило двухфазный принцип работы со сверхдетальным спутниковым изображением.

Принцип технологического подхода. Основной сложностью решения задачи оперативного автоматического выявления и подсчета сайгаков на спутниковом изображении являются малые размеры животных: каждое из них занимает на нем всего несколько пикселей. Поэтому при анализе целого спутникового изображения крайне сложно достоверно выявить всех сайгаков, исключив при этом ложные выявления. В связи с этим задачу автоматизированного подсчета животных решали в два этапа (см. схему на рис. 3). На обоих этапах использовали технологии искусственного интеллекта — глубокие конволюционные нейронные сети (ГКНС), но разной архитектуры, предназначенные для эффективной обработки изображений.

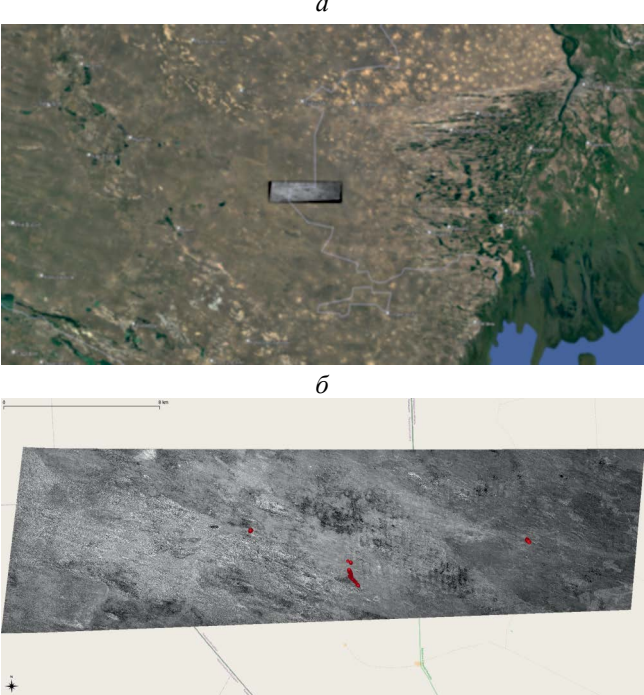


Рис. 1. Модельный участок территории Северо-Западного Прикаспия, покрытая спутниковым изображением № 1 (а), и само спутниковое изображение № 1, использованное для обучения нейронных сетей, с указанием местоположения выявленных экспертом-зоологом сайгаков (б).

Координаты:	
Восточная долгота	Северная широта
46.222229	46.176027
46.686401	46.181732
46.689148	45.774228
46.230469	45.776144

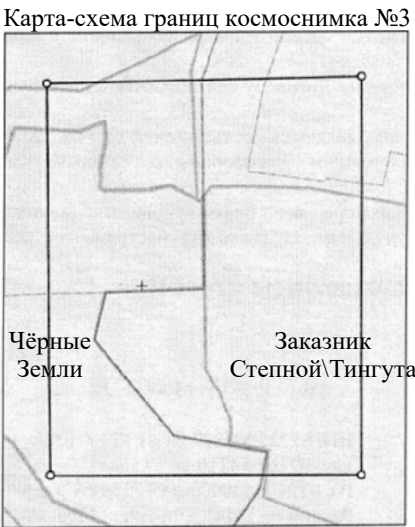


Рис. 2. Область Северо-Западного Прикаспия, отснятая спутником КА Beijing (Twenty First Century Aerospace Technology) 2.12.2022 г.

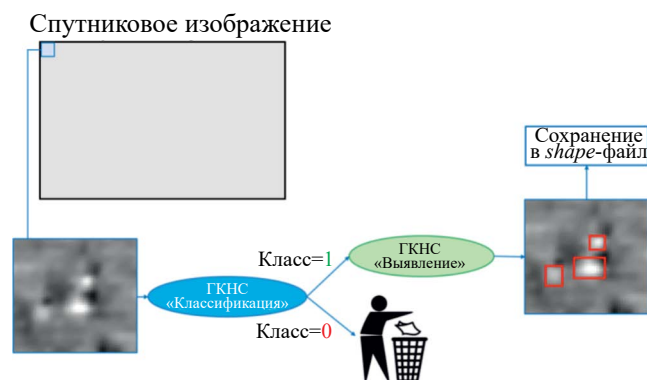


Рис. 3. Упрощенная схема обработки спутникового изображения при подсчете сайгаков.

В первую фазу анализа (работа с ГКНС «Классификация», ГКНС-К) методом скользящего окна (Zhang *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2017) была проведена фрагментация снимка на небольшие сегменты для дальнейшей последовательной их проверки на предмет обнаружения скоплений объектов малых размеров, чтобы выявить все стада копытных на исследуемой территории. После того как спутниковое изображение было разбито на равные по форме и площади фрагменты, каждый фрагмент независимо подавался на вход ГКНС-К, решающей задачу площадной классификации. ГКНС-К принимала решение о присутствии на исследуемом фрагменте изображения хотя бы одного интересующего нас объекта (сайгака). На выходе каждый фрагмент получал метку класса «0» («100% нет ни одного сайгака») или «1» («100% присутствует хотя бы один сайгак»). Для принятия решения о присвоении той или иной метки для сети устанавливался «порог приемлемой вероятности», который соответствует оптимальному значению, обеспечивающему наибольшее значение точности на валидационной выборке (см. ниже). В нашей работе установлено значение порога приемлемой вероятности 0.7. После обработки всех участков, выделенных на спутниковом изображении, был сформирован shape-файл с фрагментами класса 1 в формате полигонов, каждый из которых имеет атрибут «Probability»=[0.1]. GIS-пакеты (например, Q-GIS) дают возможность производить фильтрацию по атрибуту «Probability», что позволяет настраивать визуализацию shape-файла для удобной работы и анализа результатов ГКНС. Этот результат аналогичен результатам первой части работы эксперта-зоолога при выявлении скоплений (стад) животных вручную.

Во вторую фазу (работа с ГКНС «Выявление», ГКНС-В) анализируются только те фрагменты спутникового изображения, которые были предварительно оценены ГКНС-К как «содержащие хотя бы одного сайгака». Для этих фрагментов

использовали другую модель — они подавались на вход ГКНС-В. Результаты работы второй модели обеспечивают идентификацию каждого малого объекта (сайгака) и формирование вокруг него ограничивающего прямоугольника (bounding box).

Работа с сетью ГКНС «Классификация» (ГКНС-К). Нейронная сеть ГКНС-К разработана нами на базе стандартной архитектуры ResNet-50, предназначенной для решения задач классификации изображений, путем ее адаптации к задаче разделения фрагментов спутникового снимка на два класса («0» или «1»). В ходе обработки изображения ГКНС-К формирует на выходе значение вероятности того, что исследуемый фрагмент относится к классу «1» (такую метку присваивали лишь в том случае, если нейронная сеть оценивала вероятность наличия сайгаков на нем равной или выше 70%, в противном случае считали, что на фрагменте нет ни одного сайгака). Пороговое значение, принятое равным 0.7, является переменной величиной и при необходимости может быть изменено.

Работа с нейронной сетью ГКНС-К состояла из нескольких этапов: 1) обучение сети; 2) тестирование качества ее работы на базе исходного изображения; 3) оценка истинных положительных выявлений; 4) оценка ложных отрицательных выявлений; 5) оценка ложных положительных выявлений; 6) использование ложных положительных фрагментов для дополнительного обучения нейронной сети; 7) тестирование работы сети на базе другого спутникового изображения (с другими исходными характеристиками — дата и время съемки, прозрачность воздуха, угол падения солнечных лучей, угол съемки); 8) постобработка результатов функционирования ГКНС-К и подготовка материалов для обучения другой сети, выявляющей собственно сайгаков для подсчета (ГКНС-В).

Для обучения ГКНС-К спутниковое изображение было разделено на фрагменты фиксированного размера (64×64 пикселей) методом скользящего окна с перекрытиями (шаг 16 пикселей). Подавляющее большинство полученных фрагментов не содержало изображения сайгаков, однако 3 172 фрагмента включали в себя объекты, выявленные ранее экспертом-зоологом вручную, которые стали основой обучающей выборки (см. ниже) для тренировки и тестирования ГКНС-К. Поскольку разделение спутникового изображения производилось с перекрытием, один и тот же сайгак мог попадать на несколько разных фрагментов, что учитывалось.

Наряду с фрагментами, содержащими изображение сайгаков, в выборку примеров были включены 50 000 случайных фрагментов, не захватывающих выявленные экспертом-зоологом объекты. Таким образом, нейронной сети была предоставлена информация о многообразии изображений ложных объектов, похожих на сайгаков. Сформированная

выборка была разделена на обучающую (ОВ), валидационную (ВВ) и тестовую (ТВ) в соотношении 8:1:1. В дальнейшем обучающая выборка (51 903 примера, в том числе 2 512 фрагментов, содержащих изображение сайгаков) использовалась для обучения ГКНС-К, валидационная выборка (6 328 примеров, в том числе 313 фрагментов, содержащих изображение сайгаков) была применена для оценки качества нейронной сети в процессе ее тренировки и подбора оптимального параметра порога уверенности, а тестовая выборка (6 475 примера, в том числе 347 фрагментов, содержащих изображение сайгаков) использовалась для оценки качества функционирования ГКНС-К после завершения ее обучения.

Обучение ГКНС-К проводилось также поэтапно (два этапа, всего 300 эпох) с использованием оптимизатора Adam (Kingma, Ba, 2015) и ступенчатым изменением скорости обучения. В качестве функции ошибки была использована комбинация бинарной кросс-энтропии и среднеквадратичного отклонения. При организации процесса обучения ГКНС-К были использованы специализированные приемы тренировки на выборке с дисбалансом классов.

Тестирование на базе исходного спутникового изображения уже обученной нейронной сети ГКНС-К тоже проводилось в два этапа: на основе подготовленной тестовой выборки (фрагмент) и на основе всего снимка.

На первом этапе для тестирования ГКНС-К была взята тестовая выборка, которая не использовалась в процессе обучения. Выборка состояла из 6 475 фрагментов фиксированного размера 64×64 пикселя, в числе которых были 347 примеров, содержащих изображение сайгаков. Каждый из фрагментов поочередно и независимо обрабатывался нейронной сетью ГКНС-К. По итогам обработки фрагменту присваивалась метка класса «0» или «1». При этом результаты функционирования ГКНС-К были сопоставлены с предварительной разметкой, выполненной экспертом-зоологом. В ходе такого сравнения каждому из фрагментов была дана одна из четырех оценок (табл. 1). Затем на основе полученных статистических результатов

были рассчитаны стандартные общепринятые метрики качества функционирования нейронной сети для задачи классификации: доля правильных ответов [accuracy], точность [precision], полнота [recall] и F1-мера [F1-score], рассчитываемая по формуле $(2 * precision * recall) / (precision + recall)$. Совокупность используемых метрик качества позволяет сделать объективный вывод о качестве классификации ГКНС-К.

На втором этапе тестирования нейронной сети ГКНС-К в качестве входных данных использовали полностью фрагментированное без перекрытий исходное спутниковое изображение № 1. После его обработки формировался единый shape-файл с фрагментами, которые ГКНС-К оценила меткой «1» («имеется хотя бы один сайгак»). Эти фрагменты представлены в виде полигонов с атрибутом «вероятность», что позволяло пользователю при анализе результатов легко отображать только интересующие его фрагменты, фильтруя их на основе этого атрибута.

После обработки исходного спутникового изображения № 1 было предпринято тестирование ГКНС-К на базе спутникового изображения № 2, полученного с того же спутника, имеющего иные, но сопоставимые характеристики (пространственное разрешение, угол съемки, условия освещенности).

Результаты функционирования ГКНС-К затем были подвергнуты фильтрации, проведенной экспертом-зоологом вручную, что позволило удалить фрагменты с ложными положительными выявлениями и получить набор фрагментов, на которых имелись изображения сайгаков. Введение дополнительного буфера вокруг выявленных фрагментов, при дальнейшей обработке расширенных участков позволило не потерять информацию об отдельных особях, оказавшихся вблизи границы стада и не выявленных с помощью ГКНС-К.

Работа с сетью ГКНС «Выявление» (ГКНС-В). Нейронная сеть ГКНС-В разработана нами на базе YOLOv7 — одной из современных архитектур, используемых для решения задач выявления объектов, которая отличается высоким быстродействием,

Таблица 1. Оценки фрагментов по итогам поочередной и независимой их обработки нейронной сетью ГКНС-К

№	Название оценки	Характеристика оценки
1	Истинное положительное выявление (ИП)	ГКНС-К полагает, что на фрагменте отображен хотя бы один сайгак; эксперт-зоолог также полагает, что на фрагменте отображен хотя бы один сайгак
2	Ложное положительное выявление (ЛП)	ГКНС-К полагает, что на фрагменте отображен хотя бы один сайгак; эксперт-зоолог полагает, что на фрагменте нет ни одного сайгака
3	Истинное отрицательное выявление (ИО)	ГКНС-К полагает, что на фрагменте нет ни одного сайгака; эксперт-зоолог также полагает, что на фрагменте нет ни одного сайгака
4	Ложное отрицательное выявление (ЛО)	ГКНС-К полагает, что на фрагменте нет ни одного сайгака; эксперт-зоолог полагает, что на фрагменте отображен хотя бы один сайгак

не требует больших объемов памяти и вычислительных мощностей.

Обучающая выборка для тренировки ГКНС-В готовилась аналогично обучающей выборке для ГКНС-К. Среди полученных фрагментов подавляющее большинство их не содержало изображений сайгаков, однако 3 172 фрагмента включали в себя изображения сайгаков, выявленных ранее экспертом-зоологом. Вокруг каждого изображения сайгака была сформирована ограничивающая рамка размером в среднем 8×8 пикселей, полностью и плотно охватывающая контуры животного.

Наряду с 3 172 фрагментами, содержащими изображения сайгаков, в выборку примеров были включены 50 000 случайных фрагментов, на которых изображения сайгаков не были выявлены. Сформированная таким образом выборка так же, как и для ГКНС-К, была разделена на обучающую (ОВ), валидационную (ВВ) и тестовую (ТВ) в соотношении 8:1:1.

Обучение ГКНС-В производилось в два этапа (суммарно — 991 эпоха) с использованием оптимизатора Adam, циклическим изменением скорости обучения и среднеквадратичным отклонением в качестве функции ошибок.

Для тестирования ГКНС-В на базе спутникового изображения № 1 были использованы полигоны, на которых отображены стада сайгаков, выявленные на исходном спутниковом изображении с помощью ГКНС-К. Каждый полигон был разделен на фрагменты размером 64×64 пикселя без перекрытий, который затем обрабатывали с помощью ГКНС-В. В результате нейронная сеть выявляла объекты с различной степенью уверенности, формируя вокруг каждого из них ограничивающую рамку. Важным параметром, непосредственно влияющим на результаты выявления изображения сайгаков, является порог уверенности сети, выбранный для обработки полигонов. При высоком пороговом значении нейронная сеть выявит только те изображения сайгаков, в которых она абсолютно уверена,

что приведет, скорее всего, к недоучету животных. При низком пороговом значении будут обнаружены изображения всех сайгаков, но может добавиться много ложных выявлений (за сайгаков сеть способна принимать некоторые артефакты, не являющиеся животными). В результате тестирований в качестве оптимального был выбран порог уверенности 0.3, обеспечивающий наибольшую точность результатов, полученных на валидационной выборке.

Доработка ГКНС-В. При работе со спутниковым изображением № 3 выяснили, что характеристики снимков, полученных со спутника ВJ3A1 (декабрь 2022 г., 1600 км^2), значительно отличались от параметров ранее использованных спутниковых изображений, полученных со спутника системы EROS-B. В связи с этим все попытки непосредственного использования нейронных сетей, исходно разработанных для изображений системы EROS-B и всецело адаптированных к ней, для обработки данных спутникового изображения № 3 оказались неудачными. Для повышения качества функционирования ГКНС-В было принято решение изменить архитектуру сети, пожертвовав функцией масштабирования ради качества выявления малых объектов, повышения скорости обучения и функционирования, исключения вероятности выявления ложных объектов с размером, существенно отличающимся от размеров сайгаков, распознанных на изображениях, полученных со спутника ВJ3A1.

После доработки архитектуры ГКНС-В было выполнено ее повторное обучение. В результате ГКНС-В оказалась способна выявлять изображения сайгаков с весьма высоким качеством: точность 0.93; полнота 0.97; усредненная точность 0.94.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа с сетью ГКНС «Классификация» (ГКНС-К). Результаты обработки тестовой выборки после первого этапа обучения сети ГКНС-К

Таблица 2. Результаты обработки тестовой выборки и всего снимка и стандартные метрики качества функционирования сети ГКНС-К

Параметры	Тестирование 1	Тестирование 2
Выявления:		
Истинно положительные (ИП)	334	205
Ложно положительные (ЛП)	6	735
Истинно отрицательные (ИО)	6 122	853 252
Ложно отрицательные (ЛО)	13	3
Метрики качества функционирования нейронной сети:		
Доля правильных ответов (accuracy)	0.997	0.999
Точность (precision)	0.982	0.218
Полнота (recall)	0.963	0.986
F1-мера (F1-score)	0.972	0.356

(тестирование 1) и всего снимка (полностью фрагментированного без перекрытий исходного спутникового изображения № 1) после второго этапа обучения (тестирование 2) представлены в табл. 2.

Совокупность используемых метрик качества позволяет сделать объективный вывод о высоком качестве классификации ГКС-К с учетом дисбаланса классов в выборке. На втором этапе тестирования нейронной сети ГКС-К в качестве входных данных выступал весь снимок (полное фрагментированное без перекрытий исходное спутниковое изображение № 1) — 854 195 фрагментов. В данном случае явно выделяется большое количество ложных положительных выявлений, которые главным образом связаны с откликами нейронной сети на изображения скоплений животных, идентифицированных экспертом-зоологом, как овцы или иные млекопитающие. Этот эффект проявляется на метриках точности и F1-меры.

Истинные положительные выявления (ИП).

В ходе обработки исходного спутникового снимка ГКС-К верно классифицировала 205 из 208 фрагментов, на которых экспертом-зоологом в ручном режиме были выявлены изображения сайгаков (рис. 4).

Ложные отрицательные выявления (ЛО). В ходе обработки исходного спутникового изображения ГКС-К выявила лишь три ЛО фрагмента. При детальном рассмотрении этих фрагментов оказалось, что все три условно ошибочных решения нейронной сети являются обоснованными. В двух случаях с большой долей вероятности выявленные экспертом-зоологом объекты ошибочны, и являются изображениями не животных, а иных объектов, на что указывают их сравнительно низкая контрастность и отсутствие тени (рис. 5); еще в одном случае отмеченное экспертом-зоологом в ручном режиме местоположение изображения сайгака несколько смещено относительно центра объекта и ошибочно попадает на соседний фрагмент, который, в свою очередь, практически не захватывает объект, отмеченный экспертом-зоологом и другие целевые объекты, т.е. все три выявления являются не ложными отрицательными, а истинными отрицательными. Таким образом, при выбранном пороговом значении уверенности (0.7) нейронная сеть успешно выявила абсолютно все фрагменты, на которых точно присутствуют изображения сайгаков, т.е. полнота выявления составляет 100%.

Ложные положительные выявления (ЛП). В результате обработки спутникового изображения ГКС-К выявила 735 фрагментов типа ЛП, которые можно разделить на три группы: 1) фрагменты ЛП, смежные с фрагментами ИП (непосредственно прилегающие к зонам, занимаемым изображениями стад сайгаков); 2) фрагменты ЛП, покрывающие изображения стад животных, идентифицированных

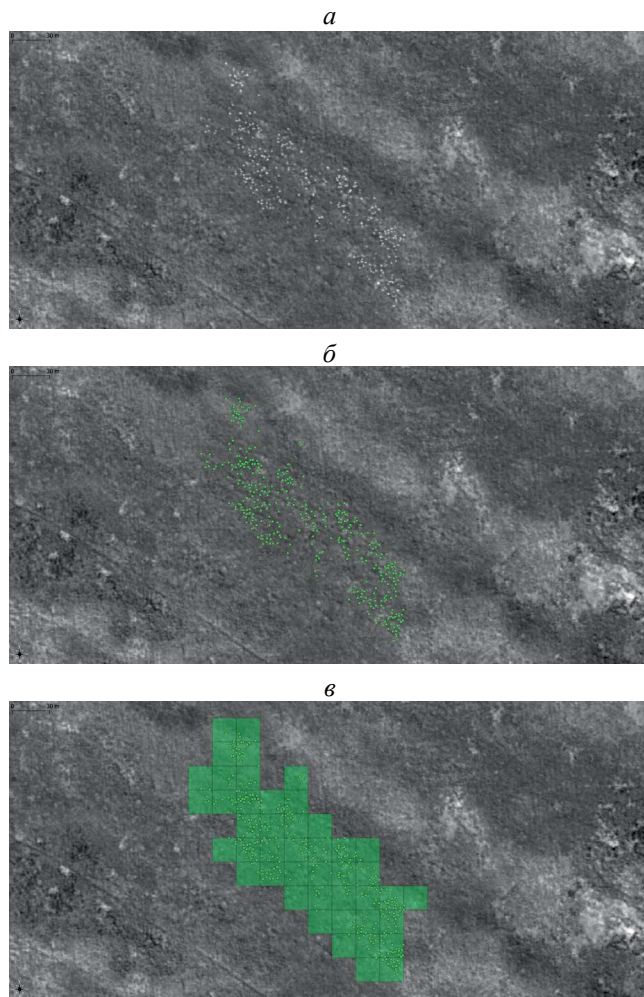


Рис. 4. Часть спутникового снимка №1 с изображением стада сайгаков (а); сайгаки, выявленные экспертом-зоологом в ручном режиме (б); ИП фрагменты снимка, выявленные нейронной сетью (в).

экспертом-зоологом как «овцы»; 3) фрагменты ЛП, частично покрывающие изображения стад животных, идентифицированных экспертом-зоологом как «иные млекопитающие» (рис. 6); 4) фрагменты ЛП, полностью или частично покрывающие изображения стад животных, не выявленные экспертом-зоологом при обработке изображения в ручном режиме; 5) отдельные изолированные фрагменты ЛП, покрывающие зоны с яркими артефактами, не являющимися изображениями животных.

Фрагменты ЛП, прилегающие к стадам сайгаков, чаще всего именно так классифицируются нейронной сетью из-за животных, частично попадающих на эти фрагменты, тогда как их основная часть вместе с точкой-координатой, установленной экспертом-зоологом, находится на смежном фрагменте ИП. Фрагменты ЛП такого рода позволяют в результате функционирования

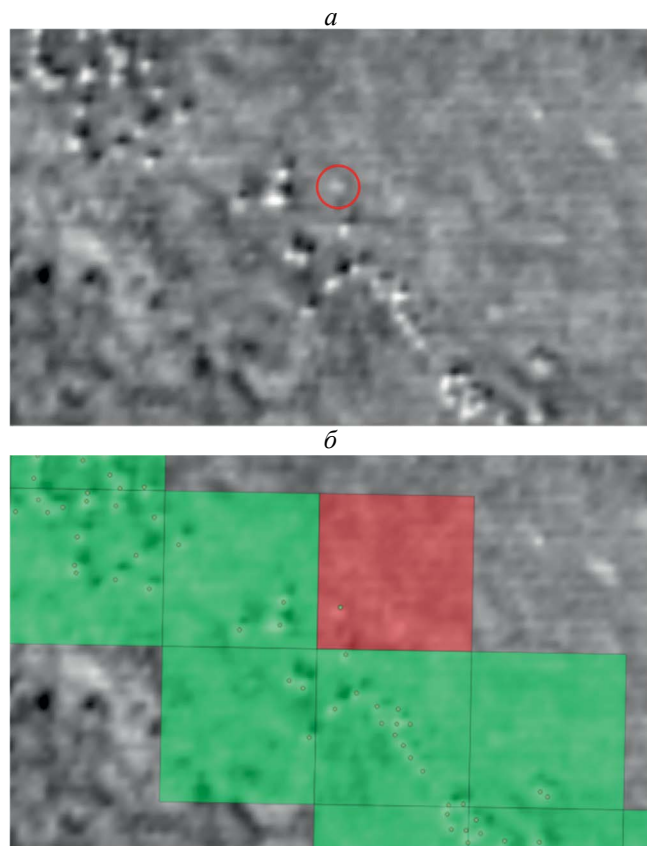


Рис. 5. Пример ложного отрицательного выявления: на спутниковом изображении №1 — обведен красной линией (а), после обработки спутникового изображения — в красном квадрате (б); выявленный экспертом-зоологом объект отличается от изображения сайгака, и, вероятно, не является животным.

второй нейронной сети — ГКНС-В — и алгоритмов постобработки формировать корректные ограничивающие рамки даже для тех выявленных объектов, которые разбиты на несколько фрагментов.

Большая часть выявленных фрагментов ЛП частично покрывает стада животных, описанных экспертом-зоологом, как овцы или иные млекопитающие. В отличие от групп сайгаков, занимающих большое количество смежных фрагментов изображения, стада овец обычно занимают 2—4 фрагмента. Они могут быть автоматически отфильтрованы по этому признаку.

Что касается «иных млекопитающих», то чаще всего речь идет об изображениях крупных стад, плотность распределения особей в которых значительно отличается от плотности распределения сайгаков (Рожнов и др., 2014, 2015). В подобных изображениях стад нейронная сеть принимает за сайгаков лишь те их части, где плотность распределения животных сопоставима с таковой характерной скоплений

сайгаков. В результате фрагменты ЛП покрывают изображение такого стада не полностью, а фрагментарно, не образуя единого полигона. По этому признаку можно отфильтровать стада таких животных и не подавать изображения со стадами не сайгаков далее на вход в ГКНС-В.

Совокупность полученных на этой стадии результатов показала, что ложные положительные фрагменты могут быть использованы для дополнительного обучения нейронной сети с целью повышения качества ее дальнейшего функционирования. Все эти фрагменты, содержащие изображения овец, иных млекопитающих и артефактов, могут быть добавлены в обучающую выборку в качестве участков местности, не содержащих изображения целевых объектов (сайгаков), что позволит нейронной сети лучше отличать изображения стад сайгаков от скоплений иных млекопитающих и артефактов.

После обработки исходного спутникового изображения было проведено тестирование ГКНС-К на базе спутникового изображения № 2. В результате было выявлено 70 фрагментов, которые ГКНС-К с уверенностью не ниже 70% оценила как территории, на которых присутствуют сайгаки (рис. 7).

Тестирование показало, что нейронная сеть, обученная на базе одного спутникового изображения, способна обрабатывать и иные спутниковые снимки, хотя качество получаемых результатов и их достоверность при этом неизбежно снижаются и возможны ошибки. Однако нейронная сеть способна выполнить наиболее важную работу — выявить (пусть и фрагментарно, с пропусками отдельных участков территории) изображения всех или большинства стад животных, присутствующих на исследуемой территории.

После фильтрации результатов функционирования ГКНС-К (удаление ложных положительных фрагментов) остаются данные, которые содержат только набор фрагментов, содержащих изображения сайгаков. Введение дополнительного буфера (рис. 8) вокруг выявленных фрагментов позволяет не потерять информацию об отдельных особях, оказавшихся вблизи границ стада и не выявленных с помощью ГКНС-К.

В результате получены участки, на которых производили подсчет сайгаков. Для идентификации каждой особи использовали ГКНС-В.

Работа с сетью ГКНС «Выявление» (ГКНС-В). При тестировании ГКНС-В был выбран порог уверенности, соответствующий 0.3, что привело к выявлению на всем спутниковом изображении №1 1 284 изображений сайгаков, тогда как экспертом-зоологом было выявлено 1 412 изображений сайгаков (рис. 9). Результаты тестирования ГКНС-В на спутниковом изображении № 1 доказывают реализуемость задачи автоматического выявления и подсчета количества сайгаков на фрагменте

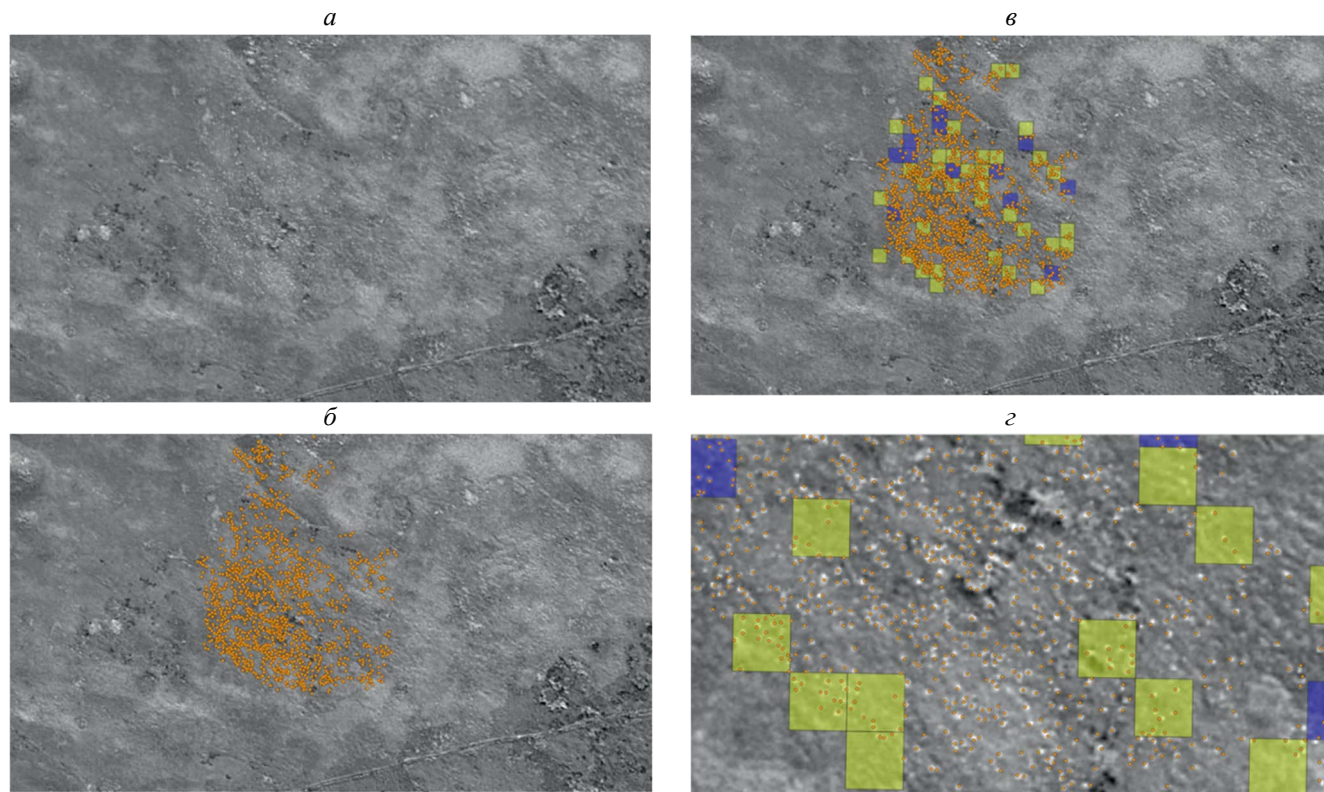


Рис. 6. Пример ложных положительных выявлений; выявлено изображение стада неизвестных животных (а, б); фрагменты ЛП (уверенность 100% — синие квадраты, уверенность от 70 до 99% — желтые квадраты) покрывают лишь разрозненные участки, на которых плотность животных сопоставима с плотностью сайгаков в стаде (в, г).

оптического спутникового изображения сверхвысокого разрешения. Обнаружение целевых объектов производится с высокими значениями показателей (полнота и точность ограничивающих рамок).

Для проверки целесообразности последовательного использования двух нейронных сетей было выполнено выявление изображений сайгаков с помощью ГКНС-В на всем спутниковом снимке без предварительного применения ГКНС-К (рис. 10). В результате было получено большое количество ложных выявлений, что доказало необходимость предварительной идентификации с помощью ГКНС-К тех зон, где расположены изображения именно стад сайгаков, и последующего подсчета животных только в этих зонах.

Доработанная сеть ГКНС «Выявление» (ГКНС-В) и спутниковое изображение № 3. Обученная и доработанная нейронная сеть была использована для анализа всех изображений, полученных в декабре 2022 г. В результате было выявлено 155 097 объектов со степенью уверенности от 0 до 50%, представляющих собой три их типа: (i) изолированные объекты, не имеющие других объектов в непосредственной близости (скорее всего, эти объекты не являются сайгаками, так как эти животные

обычно не перемещаются в одиночку во время гона); (ii) группы объектов, не имеющие в непосредственной близости от них объектов, выявленных с высокой степенью уверенности (скорее всего эти объекты не являются сайгаками); (iii) группы объектов (большое количество), рядом с которыми находятся объекты, выявленные с высокой степенью уверенности (скорее всего эти объекты являются сайгаками). Согласно результатам обработки количество сайгаков на изучаемой территории площадью 1 600 км² на декабрь 2022 г., определенное с вероятностью 0.5—1, не менее 26 584 особей. Каждый выявленный объект имеет собственный показатель уверенности от 0 до 100%. Проверка полученных результатов экспертом-зоологом показала, что большинство объектов, выявленных ГКНС-В со степенью уверенности 0.5—1, действительно являются сайгаками. Однако экспертом-зоологом были выявлены и представители крупного и мелкого рогатого скота, попавшие в распознавание нейронной сетью. Это свидетельствует о необходимости углубленной проверки экспертом-зоологом результатов работы доработанной нейронной сети ГКНС-В «Выявление», в случае ее использования

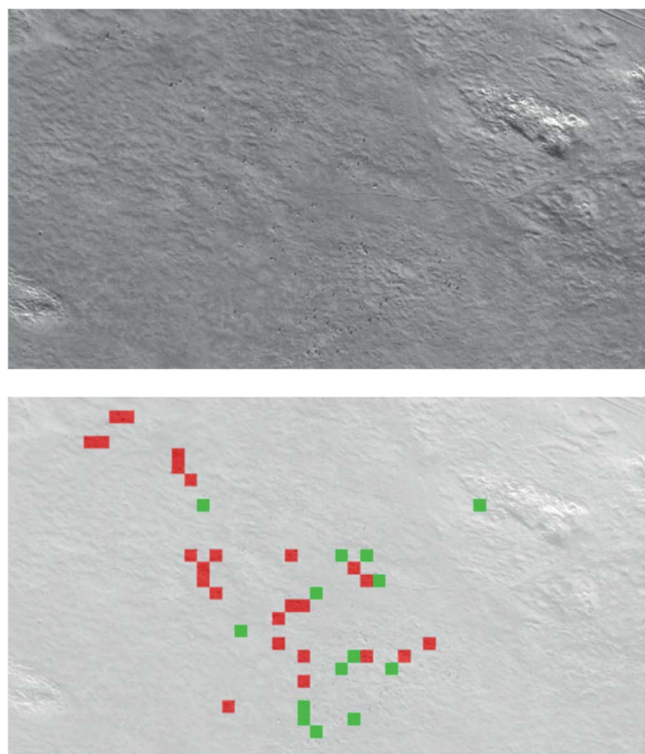


Рис. 7. Пример выявления нейронной сетью стада на спутниковом изображении №2 (зеленые квадраты — фрагменты, выявленные с уверенностью 100%; красные квадраты — фрагменты, выявленные с уверенностью от 70 до 99%).

без предварительной обработки изображений сетью ГКС-К «Классификация».

Валидационная выборка в виде результатов анализа снимков экспертом-зоологом в ручном режиме, а также метрики точности и полноты определили наилучший порог уверенности, разработанной нами сети как 50%-ную вероятность того, что идентифицированный объект является сайгаком. Если рассматривать этот показатель как грубый, то результаты подсчета, полученные при других значениях порога, выглядят следующим образом: 0.6—21 912 сайгаков, 0.7—16 809, 0.8—11 215, 0.9—4 548.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Местообитания видов диких животных, которые нередко находятся в прямой конкуренции с домашним скотом, в настоящее время активно изменяются под воздействием деятельности человека. В наибольшей степени это касается копытных открытых пространств. Для характеристики уровня такого рода конкуренции используется метод оценки интенсивности совместного использования местообитаний видами диких и домашних животных, которая

может быть пересчитана в степень нагрузки на эти местообитания (Chirichella *et al.*, 2014; Horcada-Sánchez *et al.*, 2019; Triguero-Ocaña *et al.*, 2019; Rumiano *et al.*, 2020; Linnell *et al.*, 2020; Zengrang *et al.*, 2020; Feng *et al.*, 2021; Раймонди и др., 2023). При этом, как правило, внимание уделяется экологической емкости среды, а реальные численные значения плотности видов, которые используют конкретное пространство, учитываются мало.

Распознавание и подсчет диких копытных открытых пространств (степей, пустынь, тундры) — актуальный и во многом фундаментальный вопрос, особенно когда речь идет о пугливых и уязвимых животных, таких, как, например, сайгак (Teer *et al.*, 1996). При проведении учетов копытных степных экосистем для минимизации воздействия на животных применяют малоинвазивные методы — аэрофотосъемку (Parker, 1975; Singh, Milner-Gulland, 2011; Terletzky, Ramsey, 2014; Terletzky, Koons, 2016; Кузякин, 2017; Машкин, 2022), для которой в последнее время вместо самолетов нередко используют беспилотные летательные аппараты (Barasona *et al.*, 2014; Hodgson *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2020; Schroeder *et al.*, 2020; Preston *et al.*, 2021). В последние годы появился ряд публикаций по использованию для этих целей спутниковых снимков высокого разрешения (Рожнов и др., 2014; Yang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019). Работа с такими данными сопряжена с разработкой автоматизированных методов обработки больших массивов данных на основе разномасштабных различающих признаков с использованием методов глубокого обучения (Сальман, 2021). Если по обработке данных аэрофотосъемки таких работ немало (Кузякин, 2017; Mikhailov *et al.*, 2022; Sobolevskii *et al.*, 2022), то для данных космической съемки высокого разрешения до настоящего времени такие работы практически не были проведены.

В представленной работе на примере антилопы сайгак мы подтвердили успешность и эффективность разработанной методики и алгоритма автоматического распознавания и подсчета копытных открытых пространств на спутниковых снимках высокого разрешения с высокой степенью изменчивости.

Выбор нами принципа использования сверточных нейронных сетей, способных решать задачу распознавания мелких объектов на спутниковых снимках, основан на следующих причинах. (1) Архитектура YOLO является одним из ведущих решений в различных задачах распознавания объектов. (2) Для эффективного использования потенциально более точных и популярных в последние годы моделей-трансформеров, как правило, требуется проводить обучение на огромных наборах данных или использовать модели, предобученные на решение смежных задач. Однако данные, используемые для обработки в рамках обсуждаемой задачи, являются крайне специфичными и отличными

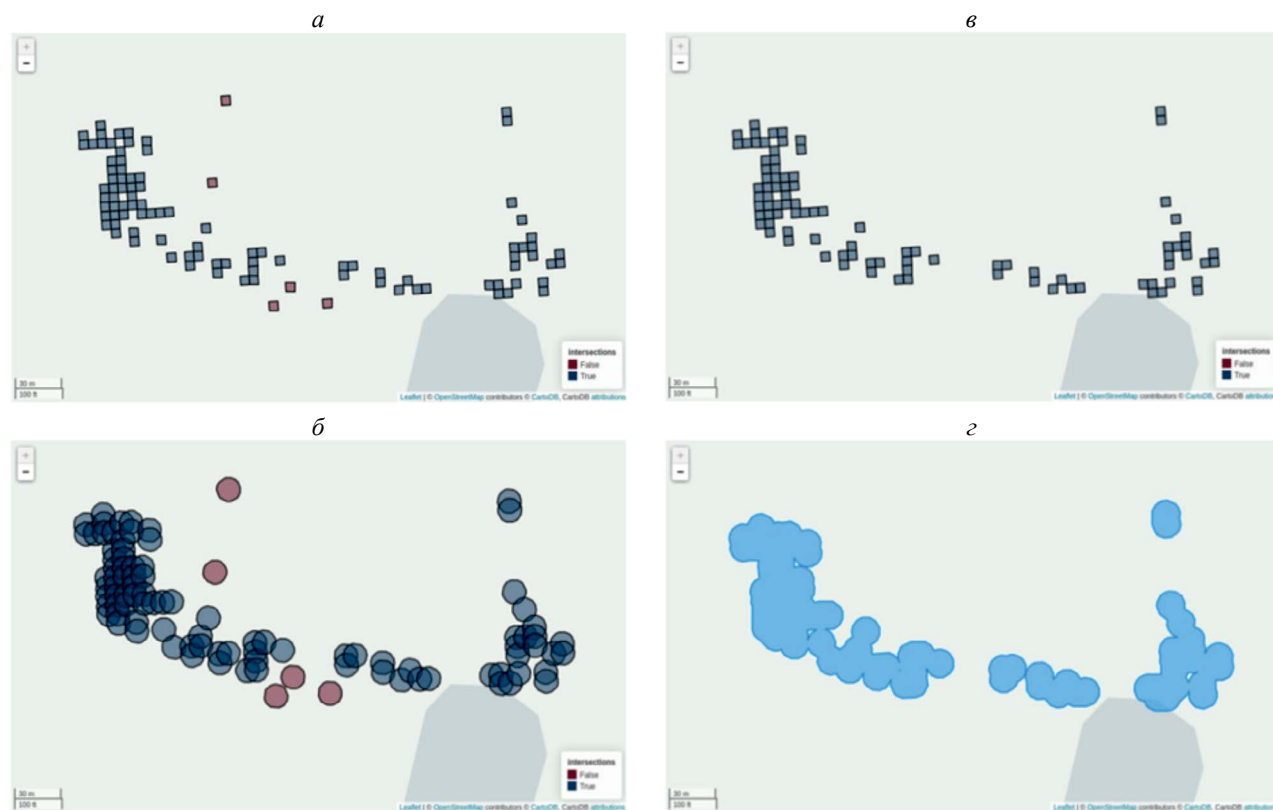


Рис. 8. Пример фильтрации результатов функционирования ГНС-К: а — первичное выделение изолированных фрагментов (фиолетовый цвет); б — построение буферов вокруг всех фрагментов и окончательное выявление изолированных фрагментов; в — фильтрация изолированных фрагментов; г — формирование территориальных зон для дальнейшей обработки.

от большинства открытых наборов данных, доступных для предобучения моделей. (3) Спутниковый снимок является огромным изображением, которое необходимо делить на большое количество фрагментов, каждый из которых обрабатывается сетью независимо. Используемые нейросетевые архитектуры должны обладать высокой скоростью инференса для обеспечения возможности оперативной обработки снимков. (4) Подходы, отличные от грубой детекции, имеют в рамках данной задачи свои недостатки. Например, с помощью метода Anomaly Detection вряд ли возможно достичь хороших результатов ввиду большого количества ложных объектов и широкого разнообразия подстилающих поверхностей. Поэтому предложенная нами разработка — методика автоматического распознавания и подсчета сайгаков на основе выбранной модели — наиболее оптимальна и современна в настоящий момент. Данная сфера развивается очень быстро, доработанные и улучшенные алгоритмы появляются практически каждые полгода (Wang *et al.*, 2024), поэтому доработка предложенной методологии может быть очень оперативной.

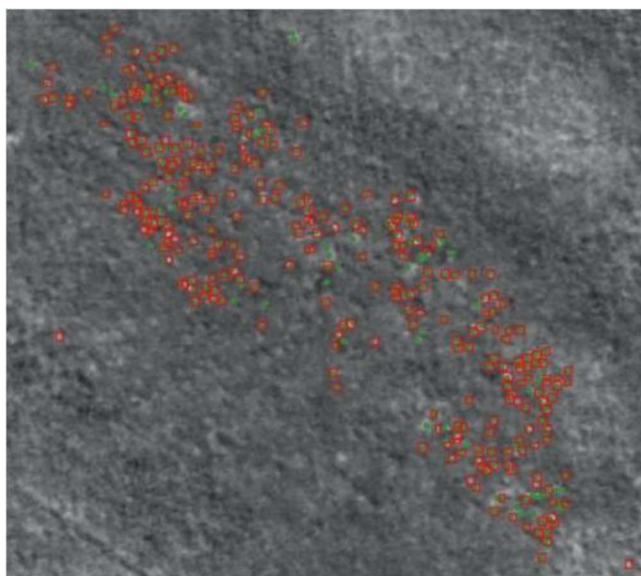


Рис. 9. Часть спутникового снимка (спутниковое изображение №1), предварительно прошедшего обработку с помощью ГНС-К, с изображениями сайгаков, выявленными экспертом-зоологом и нейронной сетью ГНС-В (красные рамки).

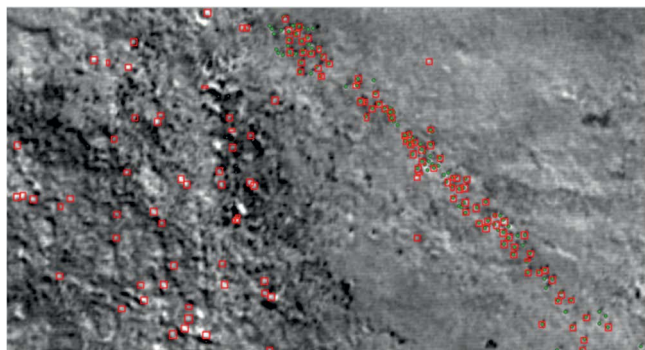


Рис. 10. Часть спутникового снимка №1, не прошедшего обработку с помощью ГНС-К, с изображениями сайгаков, выявленными экспертом-зоологом (зеленые точки), и объектами, выявленными нейронной сетью ГНС-В (красные рамки) — выявлено большое количество ложных объектов вдали от стада сайгаков.

Важным аспектом проведенной нами работы является объективность результатов и возможность их оперативного получения, а также полная проверяемость в кратчайшие сроки, и, следовательно, высокая достоверность. Сравнение результатов, полученных даже не со всего ареала, а лишь с модельной территории (например, ООПТ), регулярно, во время одного и того же периода в годовом цикле сайгака (период гона), уже высокоинформативно. Так, если в 2017–2018 гг. для территории смежных ООПТ — заповедника «Черные Земли» (Республика Калмыкия) и заказника «Степной» (Астраханская область) — во время гона с помощью ДДЗЗ было выявлено порядка 8 000 сайгаков (Yachmennikova *et al.*, 2018), то в настоящей работе нами показано, что в 2022–2023 гг. количество сайгака во время гона на этой же территории стало практически в три раза больше. Возможность такого увеличения количества сайгаков была ранее предсказана специально разработанной нами агент-ориентированной моделью популяционных процессов для данной популяции (Родникова и др., 2019).

Точные данные такого рода и возможность их оперативного получения (и, соответственно, методы их получения) необходимы для принятия решений, требующих высокого уровня компетенции и достоверности, таких как смена статуса вида в списках МСОП (Vié *et al.*, 2008) или в красных книгах. Это особенно важно для видов диких копытных, численность которых подвержена сильным колебаниям в пределах двух-трех десятков лет, каковыми, в частности, являются сайгаки, популяция Северо-Западного Прикаспия которых в течение XX в. трижды находилась на грани вымирания (Каримова и др., 2021, 2022).

Использование результатов проведенной нами работы в практической реализации очевидно.

Полнофункциональная система автоматизированного распознавания и подсчета копытных открытых пространств на спутниковых снимках высокой детальности на примере антилопы сайгак дает, в том числе, ключ к грамотному планированию совместного использования степных местообитаний домашним скотом и сайгаками. Сейчас это широко распространено и ситуативно содержит потенциальный конфликт человек — дикая природа, который предсказуемо обострится в случае интенсивного роста численности сайгака. Возможность учета при пространственном планировании путей миграции сайгаков (Рожнов и др., 2023) в условиях роста численности их популяции позволяет также грамотно предусматривать и разрабатывать новые пространственные решения, ограничивающие выпас скота, что предполагает системный отказ от электропастухов и проволочных оград, перегораживающих степь и препятствующих перемещениям сайгаков. Примером таких решений могут быть разработанные системы управления стадом в условиях замены заборов и ограждений виртуальными системами ограждений, позволяющими управлять пространством, которое использует домашний скот, без вреда для видов диких животных (Bishop-Hurley *et al.*, 2007; Umstatter, 2011; Golinski *et al.*, 2023). Используя систему GPS с прикрепленным к животному устройством предупреждения и наказания, которое срабатывает, когда животное приближается к виртуальным границам выделенной территории, можно контролировать группу скота на выпасе. В таком случае накопленный опыт работ по выявлению лидеров в группах копытных (Баскин, 1976; Ramos *et al.*, 2016), которые влияют на перемещения группы, позволяет выработать последовательный способ контроля всего стада, устанавливая соответствующие устройства не на всех особей в стаде, а лишь на избранных (Ramos *et al.*, 2021).

Таким образом, основные теоретические и практические достижения данной работы связаны с разработкой новой методологии автоматического распознавания стадных копытных открытых пространств на основе алгоритмов сверточных нейронных сетей и методов статистического анализа. Объективность такого подхода показана на уникальном по своей истории и биологии виде — сайгаке Северо-Западного Прикаспия. Полученный программный комплекс ускоряет процесс обработки спутниковых данных высокой детальности, что позволяет принимать обоснованные компетентные решения для оперативного реагирования, а также для задач охраны природы и рационального использования животного мира. Поскольку фактическая проверка результатов показала наличие как недоучета выявлений сайгаков с помощью искусственного интеллекта, так и их переучета, нами намечены пути дальнейшего улучшения разработанной методики. Дообучение и доработка нейронных сетей на существующем этапе пока

еще требует ручной верификации экспертом-зоологом. Но последующее создание более качественных сверточных нейронных сетей, позволяющих обрабатывать космоснимки, имеющие разные параметры и полученные с различных моделей спутников, без привлечения ручного дешифрирования, будет способствовать формированию системы оперативного и высокодостоверного мониторинга численности животных на основе анализа поступающих спутниковых изображений в течение нескольких часов в полностью автоматическом режиме.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы научно-исследовательских работ «Сайгак Северо-Западного Прикаспия и других территорий» при финансовой поддержке ООО «ЛУКОЙЛ-Нижневолжскнефть».

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Н.А. Кошеварову за помощь в технологическом этапе работы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа была проведена только со спутниковыми снимками животных и их анализом.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баскин Л.М. Поведение копытных животных. М.: Наука, 1976. 293 с.
- Каримова Т.Ю., Луцкекина А.А. Особенности пространственного размещения и этологической структуры популяции сайгака на территории Заказника «Степной» (Астраханская область) // Экосистемы: экология и динамика. 2018. Т. 2. № 1. С. 73—91.
- Каримова Т.Ю., Луцкекина А.А., Неронов В.М., Арылов Ю.Н., Пюрвенова Н.Ю. Прошлое и настоящее сайгака в России — есть ли будущее? // Экосистемы: экология и динамика. 2022. Т. 6. № 4. С. 5—27.
- Каримова Т.Ю., Луцкекина А.А., Неронов В.М. Современное состояние и ретроспективный анализ некоторых биологических параметров популяций сайгака, обитающих на территории России и Казахстана // Арид. экосист. 2021. Т. 27. № 2 (87). С. 56—66. DOI: 10.24411/1993-3916-2021-10151
- Каримова Т.Ю., Луцкекина А.А., Неронов В.М., Пюрвенова Н.Ю., Арылов Ю.Н. Биологические особенности популяции сайгака Северо-Западного Прикаспия в периоды разной численности // Арид. экосист. 2020. Т. 26. № 4 (85). С. 51—58. DOI: 10.24411/1993-3916-2020-10118
- Красная книга Российской Федерации, том «Животные». 2-ое издание. М.: ФГБУ «ВНИИ Экология». 2021. 1128 с.
- Кузякин В.А. Учет численности охотничьих животных. М.: Т-во научных изданий КМК, 2017. 321 с.
- Машкин В.И. Методы изучения охотничьих и охраняемых животных в полевых условиях. Санкт-Петербург: Изд-во «Лань», 2022. 448 с.
- Неронов В.М., Арылова Н.Ю., Дубинин М.Ю., Каримова Т.Ю., Луцкекина А.А. Современное состояние и перспективы сохранения сайгака в Северо-Западном Прикаспии // Арид. экосист. 2013. Т. 19. № 2 (55). С. 5—14.
- Платонов Н.Г., Мордвинцев И.Н., Рожнов В.В. О возможности использования спутниковых изображений высокого разрешения для обнаружения морских млекопитающих // Изв. РАН. Сер. биол. 2013. № 2. С. 217—226. DOI: 10.7868/S0002332913020100
- Платонов Н.Г., Рожнов В.В., Мордвинцев И.Н. Использование спутниковых изображений высокого разрешения для обнаружения морских млекопитающих: case study // Дистанционные методы исследования в зоологии. Материалы научной конференции. М.: Т-во научных изданий КМК, 2011. С. 70.
- Раймонди Ф., Сольяни Д., Чимини М., Атцени Л., Аугульяро С. Конкуренция между дикими и домашними копытными на водопоях в пустыне Гоби, Монголия // Арид. экосист. 2023. Т. 29. № 3 (96). С. 81—91. DOI: 10.24412/1993-3916-2023-3-81-91
- Родникова А.Ю., Каримова Т.Ю., Луцкекина А.А., Ячменникова А.А., Грибов К.А., Рожнов В.В., Гольцман М.Е. Индивидуум-ориентированная модель популяционной динамики сайгака Северо-Западного Прикаспия // Saiga News. 2019. № 24. С. 23—26.
- Рожнов В.В., Ячменникова А.А., Добрынин Д.В. О возможности выявления сайгака (*Saiga tatarica*) на спутниковых снимках высокого разрешения // Докл. Ак. наук. 2014. Т. 459. № 6. С. 769—773.
- Рожнов В.В., Луцкекина А.А., Ячменникова А.А., Добрынин Д.В. Как посчитать сайгаков из космоса // Астрах. вест. экол. образ. 2015. Т. 1. № 31. С. 24—33.
- Рожнов В., Ячменникова А., Эрнандес-Бланко Х., Сальман П., Чистополова М., Сальман А., Минаев А., Луцкекина А. Применение дистанционных методов и искусственного интеллекта для оценки численности популяции сайгака Северо-Западного Прикаспия и использования им пространства // Saiga News. 2023. № 29. С. 26—30.
- Сальман П.А. Система мониторинга ледовой обстановки на основе нейросетевой обработки

- радиолокационных спутниковых изображений. ВКР Магистра. 2021. 122 с.
- Сапанов М.К. Экологические последствия потепления климата в Северном Прикаспии // Арид. экосист. 2018. Т. 24. № 1 (74). С. 18—28.
DOI: 10.24411/1993-3916-1995-10003
- Сапанов М.К. Особенности и экологические последствия потепления климата в полупустыне Северного Прикаспия // Поволжск. экол. журн. 2021. № 1. С. 64—78.
DOI: 10.35885/1684-7318-2021-1-64-78
- Ячменникова А.А., Рожнов В.В., Добрынин Д.В. Возможности использования спутниковых снимков высокого разрешения для мониторинга сайгака // Saiga News. 2015. № 19. С. 19—21.
- Barasona J.A., Mulero-Pázmány M., Acevedo P., Negro J.J., Torres M.J., Gortázar C., Vicente J. Unmanned aircraft systems for studying spatial abundance of ungulates: relevance to spatial epidemiology // PloS ONE. 2014. V. 9. №12. e115608.
DOI: 10.1371/journal.pone.0115608
- Bishop-Hurley G.J., Swain D.L., Anderson D.M., Sikka P., Crossman C., Corke P. Virtual fencing applications: Implementing and testing an automated cattle control system // Comput. and Electron. in Agricul. 2007. V. 56. № 1. P. 14—22.
DOI: 10.1016/j.compag.2006.12.003
- Chirichella R., Apollonio M., Putman R. Competition between domestic and wild ungulates. Chapter 5 // Behaviour and Management of European Ungulates Caithness. Whittles Publishing. 2014. P. 110—23.
- Feng R., Lü X., Xiao W., Feng J., Sun Y., Guan Y., Feng L., Smith J.L.D., Ge J., Wang T. Effects of free-ranging livestock on sympatric herbivores at fine spatiotemporal scales // Landsc. Ecol. 2021. V. 36. P. 1441—1457.
DOI: 10.1007/s10980-021-01226-6
- Fromm M., Schubert M., Castilla G., Linke J., McDermid G. Automated Detection of Conifer Seedlings in Drone Imagery Using Convolutional Neural Networks // Rem. Sens. 2019. V. 11. 2585.
DOI: 10.3390/rs11212585
- Goliński P., Sobolewska P., Stefańska B., Golińska B. Virtual Fencing Technology for Cattle Management in the Pasture Feeding System: A Review // Agricult. 2023. V. 13. № 1. P. 91.
DOI: 10.3390/agriculture13010091
- Hodgson J.C., Baylis S.M., Mott R., Herrod A., Clarke R.H. Precision wildlife monitoring using unmanned aerial vehicles // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 22574.
DOI: 10.1038/srep22574
- Horcajada-Sánchez F., Escribano-Ávila G., Lara-Romero C., Virgós E., Barja J. The effect of livestock on the physiological condition of roe deer (*Capreolus capreolus*) is modulated by habitat quality // Scient. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 15953.
- Hu J., Wu X., Dai M. Estimating the population size of migrating Tibetan antelopes *Pantholops hodgsonii* with unmanned aerial vehicles // Oryx. 2020. V. 54. № 1. P. 101—109.
DOI: 10.1017/S0030605317001673
- Kingma D.P., Ba J.L. ADAM: A Method for stochastic optimisation // arXiv preprint arXiv:1412.6980. 2014. Published as a conference paper at International Conference on Learning Representations (ICLR). 2015. San Diego, California, United States. P. 1—15.
DOI: 0.48550/arXiv.1412.6980
- Lee J., Bang J., Yang S.I. Object detection with sliding window in images including multiple similar objects // Internati. Conf. on Inform. and Commun. Technol. Conver. (ICTC), Jeju, Korea (South), 2017. P. 803—806.
DOI: 10.1109/ICTC.2017.8190786.
- Linnell J.D.C., Cretois B., Nilsen E.B., Rolandsen C.M., Solberg E.J., Veiberg V., Kaczensky P., Moorter B., Panzacchi M., Rauset G.R., Kaltenborn B. The challenges and opportunities of coexisting with wild ungulates in the human-dominated landscapes of Europe's Anthropocene // Biol. Conserv. 2020. V. 244. 108500.
DOI: 10.1016/j.biocon.2020.108500
- Mikhailov V.V., Sobolevskii V.A., Kolpaschikov L.A. Mask R-CNN-Based System for Automated Reindeer Recognition and Counting from Aerial Photographs // In: Tuzikov A.V., Belotserkovsky A.M., Lukashovich M.M. (eds.) Pattern Recognition and Information Processing. PRIP 2021. Communications in Computer and Information Science. 2022. V. 1562. P. 137–151. Cham: Springer.
DOI: 10.1007/978-3-030-98883-8_10
- Milner-Gulland E.J., Kholodova M.V., Bekenov A., Bukreeva O.M., Grachev Iu. A., Amgalan L., Lushchekina A.A. Dramatic declines in saiga antelope populations // Oryx. 2001. V. 35(4). P. 340–345.
DOI: 10.1046/j.1365—3008.2001.00202.x
- Parker G.R. 1975. A review of aerial surveys used for estimating the numbers of barren-ground caribou in northern Canada // Polar Rec. V. 17. № 111. P. 627—638.
DOI: 10.1017/S0032247400032708
- Preston T.M., Wildhaber M.L., Green N.S., Albers J.L., De-benedetto G.P. Enumerating White-Tailed Deer Using Unmanned Aerial Vehicles // Wildl. Soc. Bull. 2021. V. 45. № 1. P. 97—108.
DOI: 10.1002/wsb.1149
- Prosekov A., Kuznetsov A., Rada A., Ivanova S. Methods for Monitoring Large Terrestrial Animals in the Wild // Forests. 2020. V. 11. P. 808.
DOI: 10.3390/f11080808
- Ramos A., Bousquet Christophe A.H., Sueur C. How leadership could be used to manage domestic and wild ungulate herds // App. Anim. Behav. Sci. 2021. V. 239. P. 105326.
DOI: 10.1016/j.applanim.2021.105326
- Ramos A., Petit O., Longour P., Pasquaretta C., Sueur C. Space Use and Movement Patterns in a Semi-Free-Ranging Herd of European Bison (*Bison bonasus*) // PLoS ONE. 2016. V. 11. № 2. e0147404.
DOI: 10.1371/journal.pone.0147404
- Rumiano F., Wielgus E., Miguel E., Chamailé-Jammes S., Valls-Fox H., Cornélis D., Garine-Wichatitsky M.D., Fritz H., Caron A., Tran A. Remote Sensing of Environmental Drivers Influencing the Movement Ecology

- of Sympatric Wild and Domestic Ungulates in Semi-Arid Savannas, a Review // *Rem. Sens.* 2020. V. 12. P. 3218. DOI: 10.3390/rs12193218
- Schroeder N.M., Panebianco A., Gonzalez M.R., Carmancha-hi P. An experimental approach to evaluate the potential of drones in terrestrial mammal research: a gregarious ungulate as a study model R // *Soc. Open Sci.* 2020. P. 7191482191482. DOI: 10.1098/rsos.191482
- Singh N.J., Milner-Gulland E.J. Monitoring ungulates in Central Asia: current constraints and future potential // *Oryx*. 2011. V. 45. № 1. P. 38–49. DOI: 10.1017/S0030605310000839
- Sobolevskii V.A., Kolpaschikov L.A. Mask R-CNN-Based System for Automated Reindeer Recognition and Counting from Aerial Photographs // *Pattern Recognition and Information Processing: 15th International Conference, PRIP, Minsk, Belarus, September 21–24, 2021. Revised Selected Papers.* Springer Nature. 2022. P. 137.
- Tarca A.L., Carey V.J., Chen X., Romero R., Drăghici S. Machine Learning and Its Applications to Biology // *PLoS Comput Biol.* 2007. V. 3. № 6. e116. DOI: 10.1371/journal.pcbi.0030116
- Teer J.G., Neronov V.M., Zhirnov L.V., Blizniuk A.I. Status and exploitation of the saiga antelope in Kalmykia, Chapt. 6 / Ed. Taylor, V.J., Dunstone, N. *The Exploitation of Mammal Populations*: Springer, Dordrecht, Netherlands, 1996. P. 75–87. DOI: 10.1007/978-94-009-1525-1_6
- Terletzky P., Ramsey R.D. A Semi-Automated Single Day Image Differencing Technique to Identify Animals in Aerial Imagery // *PLoS ONE*. 2014. 9. № 1. e85239. DOI: 10.1371/journal.pone.0085239
- Terletzky P.A., Koons D.N. Estimating ungulate abundance while accounting for multiple sources of observation error // *Wildl. Soc. bull.* 2016. V. 40. № 3. P. 525–536. DOI: 10.1002/wsb.672
- Triguero-Ocaña R., Barasona J.A., Carro F., Soriguer R.C., Vicente J., Acevedo P. Spatio-temporal trends in the frequency of interspecific interactions between domestic and wild ungulates from Mediterranean Spain // *PLoS ONE* 2019. V. 14. № 1. e0211216. DOI: 10.1371/journal.pone.0211216
- Umstatter C. The evolution of virtual fences: A review // *Comp. and Elect. in Agricul.* 2011. V. 75. № 1. P. 10–22. DOI: 10.1016/j.compag.2010.10.005
- Vié J.C., Hilton-Taylor C., Pollock C., Ragle J., Smart J., Stuart S.N., Tong R. The IUCN Red List: a key conservation tool // *Wildlife in a changing world — An analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened Species* / Eds. Vié J.C., Hilton-Taylor C., Stuart S.N.: Gland, Switzerland, IUCN. 2008. P. 1–13.
- Wang C.Y., Yeh I.H., Liao H.Y.M. YOLOv9: Learning What You Want to Learn Using Programmable Gradient Information // *arXiv preprint 2024.* arXiv:2402.13616. <https://arxiv.org/pdf/2402.13616.pdf>
- Wang D., Shao Q., Yue H. Surveying Wild Animals from Satellites, Manned Aircraft and Unmanned Aerial Systems (UASs): A Review // *Rem. Sens.* 2019. V. 11. P. 1308. DOI: 10.3390/rs11111308
- Yachmennikova A., Rozhnov V., Dobrynin D., Karimova T., Lushchekina A. Experience of identifying the saiga antelope (*Saiga tatarica*) on very high resolution satellite images as a method for estimation of their number // *Conservation Asia 2018*, Bishkek. 2018. *The Book of Abstracts*. P. 53.
- Yang Z., Wang T., Skidmore A.K., de Leeuw J., Said M.Y., Freer J. Spotting East African Mammals in Open Savannah from Space // *PLoS ONE*. 2014. V. 9. № 12. e115989. DOI: 10.1371/journal.pone.0115989
- Zengrang X., Ziqian W., Mingming J. Causes of domestic livestock—wild herbivore conflicts in the alpine ecosystem of the Chang Tang Plateau // *Environmental Development*. 2020. V. 34. P. 100495. DOI: 10.1016/j.envdev.2020.100495.
- Zhang J., Zhao X., Huang Y., Huang K., Tan T. Semantic windows mining in sliding window based object detection // *Proceed. of the 21st Internat. Conf. on Patt. Recogn. (ICPR2012)*. Tsukuba, Japan. 2012. P. 3264–3267.

Automated identification and counting of saigas (*Saiga tatarica*) by using deep convolutional neural networks in high-resolution satellite images

V. V. Rozhnov^{1, #}, A. L. Salman², A. A. Yachmennikova¹,
A. A. Lushchekina¹, P. A. Salman²

¹*Institute of Ecology and Evolution named after. A.N. Severtsov Russian Academy of Sciences,
Leninsky Prospekt, 33, Moscow, 119071 Russia*

²*ES-PAS LLC, Leningradskoye sh., 15, Moscow, 125171 Russia*

[#]*E-mail: rozhnov-v-2015@yandex.ru*

We utilized a two-phase analysis using deep convolutional neural networks (DCNN) to create an automated technology that enabled us to detect and count saigas (*Saiga tatarica*) in satellite images with a resolution of 0.3–0.5 m/pixel (Eros-B 2012; 2013 and Beijing KA 2022 satellites). In the first phase, the satellite image is automatically divided into sections and checked for the presence or absence

of clusters of objects (the “classification” phase). Then, during the second phase, only the fragments of the satellite image where at least one saiga was previously found are analyzed (the “detection” phase). The method was calibrated by training a neural network on the results of the preliminary processing of archival satellite images from 2012 and 2013, carried out manually by zoological experts. When we tested the DCNN work with a “confidence threshold” of 0.3, we identified 1,284 saigas on the entire model satellite image, while a zoological expert manually identified 1,412 saigas. For practical use and to assess the effectiveness of this method, we counted saigas on a 2022 image covering two adjacent specially protected natural areas (PAs) located in the Republic of Kalmykia and the Astrakhan region (Russian Federation). The results are presented with different “thresholds of confidence”.

Keywords: population assessment, saiga, Saiga tatarica, remote sensing, neural networks, SCNS, AI, animal counting, automated non-invasive methods

УДК 591.5 577.4.620.197

НАЛИЧИЕ И МИКРОСТРУКТУРА ПУХОВЫХ КОМПОНЕНТОВ ПЕРЬЕВ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ДЕВЯТНАДЦАТИ ОТРЯДОВ ПТИЦ (AVES)¹

© 2024 г. О.Л. Силаева, С.А. Букреев, Р.М. Хацаева®

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Ленинский проспект, 33, Москва, 119071 Россия

®E-mail: r.khatsaeva@mail.ru

Поступила в редакцию 26.03.2024 г.

После доработки 25.04.2024 г.

Принята к публикации 25.04.2024 г.

С помощью световой и растровой электронной микроскопии нами впервые изучена микроструктура пуховой части опахала перьев, которая состоит из комбинированных бородок (“бородки I”), снабженных как типичными пуховыми лучами (“бородочки”, “бородки II”), так и модифицированными пуховыми лучами (МЛ). Их присутствие и распределение по разным птерилиям исследованы на 3330 перьях от 441 особи 129 видов птиц, относящихся к 45 семействам 19 отрядов. Уточнены сведения о наличии дополнительного пера и пупочного пуха на перьях. МЛ обнаружены на перьях у представителей всех исследованных видов, чаще на покровных перьях, реже — на маховых и рулевых. Наиболее детально исследованы пуховые компоненты в отрядах Charadriiformes и Passeriformes: у первых наличие или отсутствие МЛ специфично на уровне семейства и вида; у вторых дополнительное перо или пупочный пух и МЛ вместе на одном перье не встречаются. Обсуждается возможность использования различных комбинаций пуховых компонентов и особенностей их микроструктуры в качестве существенного дополнения к комплексной системе птицологической идентификации таксона птицы по перу (в том числе единичному), а также, в некоторых случаях, даже по птерилии, которой принадлежит тестируемое перо.

Ключевые слова: птицология, пуховые структуры пера, микроструктура пера, идентификация по структуре пера.

DOI: 10.31857/S1026347024050088, **EDN:** ulenle

Перьевой покров птиц отличается полиморфностью, и перья подразделяются на два основных типа — летательные (маховые и рулевые) и покровные (контурные, полупуховые и пуховые). Полупуховое перо имеет небольшую контурную часть, а пуховой участок занимает не менее двух третей площади опахала, т.е. в этих перьях доля пуховой части может составлять около 70% площади опахала (Nitzsch, 1840; Lucas, Stettenheim, 1972; Spearman, Hardy, 1985; Чернова и др., 2006). Пуховые бородки снабжены лучами (термин, применяемый нами; синоним терминов “бородочки”, “бородки II, англ. modified radii, barbules”), микроструктура которых различается в зависимости от расположения и строения, что позволило нам выделить комбинированные бородки, несущие *модифицированные пуховые лучи* (КБм). Ранее КБм были найдены нами у Corvidae и некоторых других групп птиц (Силаева, Гуменюк, 2008; Силаева и др., 2012, 2013, 2015, 2018). Наиболее подробно эти и другие пуховые компоненты описаны нами

у Passeriformes и Charadriiformes (Силаева и др., 2018). Примечательно, что в последнем отряде сходные для всех семейств этого отряда морфологические признаки перьев малочисленны.

Всего в перьях изученных нами видов выделяются пуховые структуры трех типов: типичные лучи комбинированных бородок с типичными пуховыми лучами (КБт) (Силаева, Гуменюк, 2008; Dey *et al.*, 2021); модифицированные лучи комбинированных бородок с модифицированными пуховыми лучами (КБм); пуховые лучи бородок дополнительного пера (ДП) и пупочного пуха (ПП). Дополнительное перо (лат. *hypopenna*; англ. afterfeather) и пупочный пух (лат. *hypopluma*; англ. umbilical barbs) довольно хорошо изучены (Chandler, 1916; Войткевич, 1962; Ziswiller, 1962; Lucas, Stettenheim, 1972), и мы уделяем внимание этим компонентам пуха по причине их общности для перьев. ДП является элементом перьевой пары, в которую входит и основное перо (Силаева, Горохова, 2017).

¹Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S1026347024050088

Обнаруженные и описанные нами новые компоненты пера (КБт и КБм) важны для таксономической идентификации птиц в разных аспектах теории (например, для решения проблемы эволюции перьевого покрова) и практики (в частности, идентификации видов птиц по перу). Работы по морфологии перьев имеют фундаментальное значение в рамках нового направления птилологии — в систематических и филогенетических исследованиях, основанных на диагностических признаках перьев, свидетельствующих не только о таксономическом статусе, но и о филогенетическом родстве разных таксонов, и, возможно, о популяционной и индивидуальной изменчивости (Силаева и др., 2012, 2013, 2015, 2018).

Целью настоящей работы является констатация присутствия пуховой структуры КБм и ее описание, а также инвентаризация наличия КБм и КБт на полупуховых и контурных перьях у птиц из различных отрядов и семейств.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были контурные и полупуховые покровные перья основных птерилий:

плечевой (*pteryla humeralis*), дорзальной шейной (*pteryla cervicalis dorsalis*), вентральной шейной (*pteryla cervicalis ventralis*), межлопаточной (*pteryla interscapularis*), грудной (*pteryla pectoralis*), грудинной (*pteryla sternalis*), брюшной (*pteryla abdominalis*), бедренной (*pteryla femoris*) и тазовой (*pteryla pelvina*). Изучены также маховые (*remiges*; ед. число *remix*) и рулевые (*rectrices*; ед. число *rectix*) перья и их кроющие (*tectrices*) (терминология по: Lucas, Stettenheim, 1972).

Всего было исследовано 3330 перьев от 441 особи 129 видов птиц, относящихся к 45 семействам 19 отрядов (см. Приложение). Систематика, включая порядок следования отрядов, семейств и видов, приводится согласно последней версии списка птиц мировой фауны Международного союза орнитологов (бывший Международный орнитологический комитет) (Gill, Donsker, Rasmussen, 2024), учитывающей и последние достижения в области молекулярной систематики. Русские научные названия птиц приняты по Е.А. Коблику и В.Ю. Архипову (2014).

Изучен материал перьевых коллекций Лаборатории экологии и управления поведением птиц ИПЭЭ РАН, перьевых сборов В.М. Гудкова, К.С. Кузьминой, ООО “Эко-эксперт”, а также от непригодных для экспонирования тушек из фонда

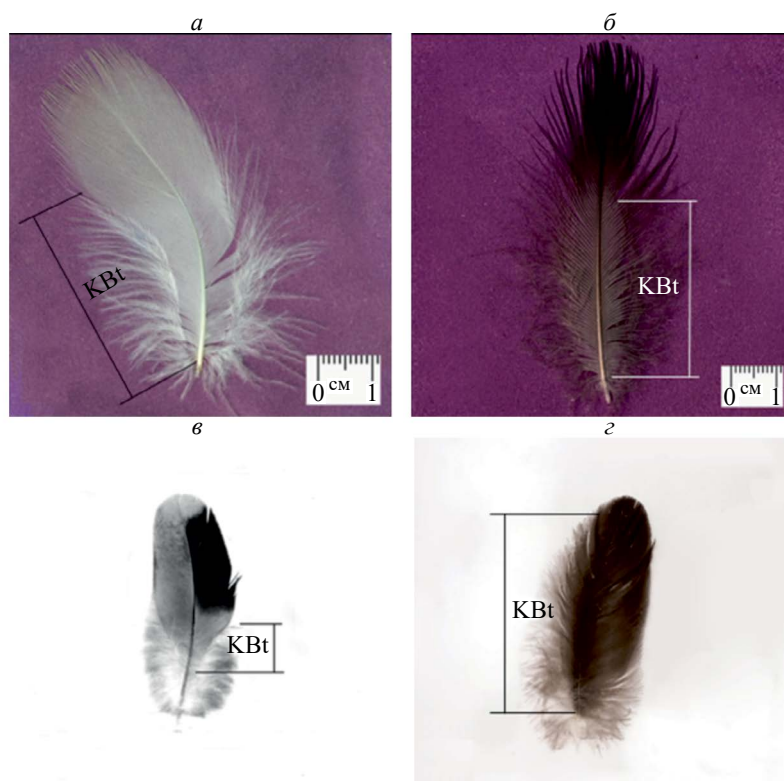


Рис. 1. Комбинированные бородки с типичными пуховыми лучами на покровных перьях (КБт, КБт): а — чегравы (*Hydroprogne caspia*); б — белобрюшки (*Aethia psittacula*); в — на кроющих маховых сизого голубя (*Columba livia*); г — ворона (*Corvus corax*). а — вентральная сторона; б, в, г — дорзальная.

Научно-исследовательского Зоологического музея Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Для исследования перьев в проходящем свете методами светлого и темного полей использовали светооптический микроскоп LEICA DMR (Leica Microsystems, Germany), оснащенный фотокамерой JVC 3 CCD C-MOUNT; перьевой материал монтировали на предметные стекла. Для изучения материала в растровом электронном микроскопе изготавливали препараты продольных и поперечных сечений бородок перьев, прикрепленных на специальные столики. Затем для создания токопроводящей поверхности образцы напыляли золотом на оборудовании Q150R ES Plus (Quorum Technologies Ltd., Соединенное Королевство, ОКСМ-826). Электронные изображения получали с помощью растрового электронного микроскопа Tescan MIRA3 LMN ОКСМ-203 (Brno, s.r.o., Чешская Республика), оснащенного катодом Шоттки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Комбинированные бородки с типичными пуховыми лучами (КБт) встречаются преимущественно в базально-медиальных частях опахала полупуховых и контурных покровных, кроющих маховых и рулевых перьев, хотя у последних их количество меньше и разнится у разных видов. Однако у некоторых видов на перьях из некоторых птерилий КБт могут проходить вдоль всего опахала по его наружному краю, например, у Corvidae на кроющих перьях маховых и рулевых перьев. Но чаще КБт располагаются на границе пухового и контурного участков опахал и несут на отдельных сегментах разные по типу лучи: пуховые и контурные (рис. 1).

Обычно участки контурных перьев с КБт выглядят как билатеральные структуры в виде узких или широких, симметричных или ассиметричных конусовидных полос, обрамленных пухом (рис. 1). В полупуховых покровных перьях груди, спины, брюха, плеча, таза, бедра, а также в мелких кроющих перьях маховых и рулевых перьев КБт могут занимать значительную часть опахал, оставляя для контурных бородок апикальную часть пера (рис. 1б, г). В проксимальном вертикальном направлении контурные полосы или конусы могут доходить непосредственно до верхнего пупочного отверстия, замещая пуховые бородки (рис. 1а, б). В перьях мелких Passeriformes структуры КБт слабо развиты. В контурных кроющих перьях маховых и рулевых перьев встречаются полосы, проходящие преимущественно по одной части опахала так, что одна часть опахала кроющих маховых может полностью состоять из КБт (рис. 1г). КБт имеются у птиц из всех изученных нами отрядов (табл. 1). Только у Strigiformes отмечены КБт и на маховых перьях с гребенчатыми структурами.

Комбинированные бородки с модифицированными пуховыми лучами (КБм) обычно расположены в дистально-медиальной части опахала (рис. 2). К КБм прикрепляются модифицированные пуховые лучи (МЛ). МЛ хорошо развиты

Таблица 1. Сравнительная характеристика присутствия пуховых компонентов перьев в изученных отрядах птиц

Отряд	Пуховые компоненты*		
	КБт	ДП/ПП	КБм
Anseriformes	+	ПП	—
Galliformes	+	+	—
Caprimulgiformes	+	В основном ДП	—
Apodiformes	+	+	+
Otidiformes	+	В основном ПП	—
Cuculiformes	+	ПП	—
Pterocliiformes	+	В основном ПП	+
Columbiformes	+	ПП	—
Gruiformes (Rallidae)	+	В основном ПП	—
Gruiformes (Gruidae)	+	В основном ДП	—
Podicipediformes	+	+	—
Charadriiformes	+	+	+
Pelecaniformes	+	ДП	—
Accipitriformes	+	В основном ПП	—
Strigiformes	+	В основном ПП	+
Bucerotiformes	+	—	—
Coraciiformes	+	—	+
Piciformes	+	+	+
Falconiformes	+	В основном ПП	—
Passeriformes	+	+	+

Примечание. * Пуховые компоненты перьев: КБт — комбинированные бородки с типичными пуховыми лучами, ДП — дополнительное перо, ПП — пупочный пух, КБм — комбинированные бородки с модифицированными пуховыми лучами; + обозначает присутствие структуры; — обозначает отсутствие структуры.

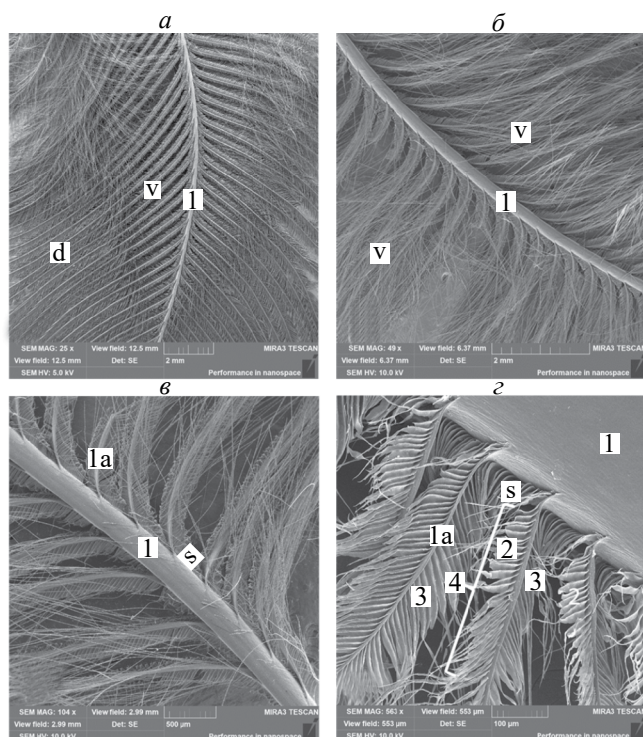


Рис. 2. Область модифицированных лучей (МЛ) на межлопаточных перьях: — а, б, в — серой вороны (*Corvus cornix [corone]*) и г — черныша (*Tringa ochropus*); а — дорзальная сторона; б, в, г — вентральная. 1 — стержень пера; 1а — стержень бородачки; d — выход бородачных опахалец МЛ на дорзальную сторону; v — выход бородачных опахалец МЛ на вентральную сторону; s — стержневые МЛ; 2 — дистальные контурные лучи с крючками; 3 — проксимальные контурные лучи с зубринами; 4 — подопухальцевая зона.

на межлопаточной, грудной и грудинной, дорзальной и вентральной шейных, спинной, плечевой, тазовой, брюшной, реже на бедренной птерилиях. КБм встречаются не на каждом перье из указанных птерилий, обычно на одном-трех из пяти в зависимости от вида птицы и расположения птерилии. При этом нужно подчеркнуть неравномерность распределения КБм по перьям из одной птерилии и их отсутствие или присутствие на перьях из разных покровных птерилий. Например, у саджи (*Syrhaptes paradoxus*) КБм присутствуют только на перьях из брюшной птерилии. На кроющих перьях КБм почти не встречаются, за исключением *Corvidae*. На летательных перьях МЛ отсутствуют.

Если КБт, как указано выше, имеют два участка — контурный и пуховой, то КБм состоят из чередующихся участков: контурных у основания бородачки (не у всех видов), пуховых с МЛ и контурных на дистальных участках бородачек. Контурные лучи скреплены между собой или разрознены.

В большинстве случаев при визуальном просмотре или при микроскопировании с небольшим увеличением граница области МЛ просматривается как темная или светлая полоса серебристого цвета, образованная более длинными по сравнению с таковыми контурными лучей, опахальцами МЛ. Область МЛ четко просматривается, если бородачки и лучи находятся в естественном положении (рис. 2).

Более подробно рассмотрим МЛ крупных и разнообразных отрядов Charadriiformes и Passeriformes. Отметим, что в отряде Charadriiformes имеется незначительное число общих для всех семейств морфологических признаков.

Charadriiformes

Большинство изученных межлопаточных перьев куликов снабжены КБм. При этом у вальдшнепа (*Scolopax rusticola*), большого кроншнепа (*Numenius arquata*) и большого веретенника (*Limosa limosa*) КБм не обнаружены.

В зависимости от пигментации элементов МЛ эти лучи визуально выглядят темными или светлыми серебристыми. Так, у турухтана (*Philomachus pugnax*) (рис. 3), травника (*Tringa totanus*), мордунки (*Xenus cinereus*), черныша (*Tringa ochropus*) и чибиса (*Vanellus vanellus*) узлы МЛ сильно пигментированы. У золотистой ржанки (*Pluvialis apricaria*) они слабо пигментированы, у кулика-сороки (*Haematopus ostralegus*) окрашены и узлы, и, частично, междоузлия МЛ. У тулеса (*Pluvialis squatarola*) опахальца МЛ серебристого цвета за счет непигментированных узлов и междоузлий. При этом мы не обнаружили при разных увеличениях микроскопии пера какой-либо четкой зависимости между пигментацией микроструктурных элементов и пигментацией самого пера у этих видов. У Charadriiformes область МЛ распространяется до базальной части опахала, приобретая овальную форму. Билатерально и дистально по отношению к области МЛ расположены контурные лучи, часто сохраняющие сцепление. В покровных перьях некоторых ржанок сосредоточены все описанные выше пуховые компоненты (рис. 3).

Passeriformes

МЛ хорошо развиты у птиц из всех исследованных семейств этого отряда. Область МЛ может иметь форму клина или распространяться в вертикальном проксимальном направлении, захватывая медиально-базальную часть опахала пера, приобретая продолговатую форму, подобную таковой у Charadriiformes. Дистальные части опахала большинства контурных и полупуховых покровных перьев представителей изученных семейств Passeriformes носят видоспецифическую окраску, в то время как медиально-базальные пуховые части этих перьев, которые не служат видовым партнерам для визуального распознавания друг друга, окрашены в оттенки серого цвета, и на границе этих зон располагается область МЛ.

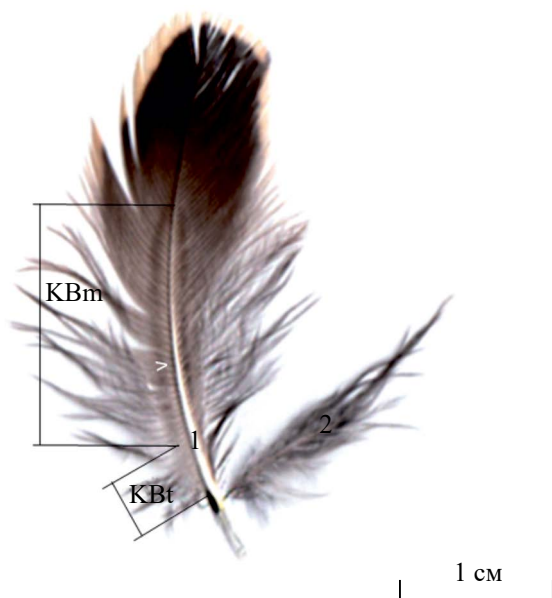


Рис. 3. Пуховые структуры пера турухтана (*Philomachus pugnax*); (вентральная сторона). 1 — стержень пера; KBm — комбинированные модифицированные бородки; KBt — типичные комбинированные бородки; v — выход бородочных опахалец модифицированных лучей на вентральную сторону; 2 — дополнительное перо.

У Corvidae область МЛ, как правило, четко очерчена и присутствует на многих покровных перьях. Она представлена одноименными лучами, при этом с дистальной стороны, на билатеральном клиновидном участке опахальца МЛ выходят на вентральную сторону (рис. 2а), приобретая таким образом форму клина. Опахальца пограничных МЛ выходят на дорзальную сторону. При этом область МЛ в виде клина у Corvidae — гораздо более частое явление, чем у других видов отряда. У грача (*Corvus frugilegus*) область МЛ с выходом опахалец на вентральную сторону опахала пера чаще образует широкие полосы; для серой вороны (*Corvus cornix*) кроме клиновидной области характерны и узкие билатеральные полосы.

Дополнительное перо и пупочный пух. ДП выходит из верхнего пупочного отверстия очина пера. Пупочный пух лишен стержня и состоит только из пуховых бородок, которые крепятся к краям верхнего пупочного отверстия.

Пуховые компоненты в разных систематических группах птиц мозаично распределяются в перьях из разных птерилий и групп птиц внутри таксонов. У представителей всех исследованных таксонов обнаружены КБт. В перьях представителей отрядов Podicipediformes, Galliformes, Anseriformes, Falconiformes, Accipitriformes, Columbiformes, Upupiformes и семейств Laridae, Alcidae и Stercorariidae отряда Charadriiformes КБм они не найдены (табл. 1).

У некоторых куликов — вальдшнепа, большого кроншнепа и большого веретенника — КБм также не обнаружены.

Отряд Charadriiformes — единственный из исследованных нами, где семейства и даже виды, входящие в эти семейства, различаются по наличию или отсутствию КБм.

У Anseriformes хорошо развиты КБт даже на второстепенных маховых. Опахала кроющих третьестепенных маховых почти полностью обрамлены пуховыми частями КБт.

В оперении Laridae, Alcidae и Stercorariidae хорошо развиты ДП практически на всех покровных перьях. Причем ДП занимают в длину до двух третей длины основного пера. В полупуховых покровных перьях чистиков почти на каждом пере есть КБт, равномерно распространенные по обеим частям опахала. На большинстве всех исследованных полупуховых покровных перьях у Scolopacidae, Charadriidae, Haematorodidae и Glareolidae присутствует ДП, длина которого составляет обычно одну треть от длины основного пера. В этих группах есть все три пуховые структуры: КБт, КБм, ДП и ПП (табл. 1); они могут встречаться одновременно в перьях одного вида.

У Strigiformes, Accipitriformes и Falconiformes пуховая часть занимает до двух третей опахала в покровных перьях. У Gruiformes КБм обнаружены только у султанки (*Porphyrio porphyrio*) и коростеля (*Crex crex*). У Coraciiformes — у обыкновенного зимородка (*Alcedo atthis*). Для Columbiformes и Galliformes характерны вытянутые продолговатые перья туловища, где пуховые части опахал занимают до 70%. У Psittaciformes только на межлопаточных и на перьях шейной птерилии есть четкие МЛ. У представителей отряда Passeriformes ДП и МЛ вместе на одном пере не встречаются. У видов, не имеющих КБм, разреженный участок в подопахальцевой области прикрывается обычно с вентральной стороны хорошо развитым ДП.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

История изучения перьевых структур насчитывает столетия. Контурные (перообразные) и пуховые бородки, формирующие опахало, хорошо известны (Nitzsch, 1840; Chandler, 1916; Ильичев, 1963; Lucas, Stettenheim, 1972; Stettenheim, 2000), поэтому мы особое внимание уделили третьему малоизученному типу бородок — комбинированным бородкам с типичными пуховыми лучами или с модифицированными пуховыми лучами.

Цветовой рисунок опахала, важнейшей части пера, служит показательным признаком для определения вида птицы. При этом структура опахала мало изучена, однако ее компоненты могут нести диагностические признаки, например, такие как

комбинированные бородки и опахальца лучей, которые различаются на разных участках опахала, как контурного, так и пухового. В наших предыдущих работах (Силаева, Гуменюк, 2008; Силаева и др., 2012) отмечены модифицированные лучи, но бородки с такими лучами еще не были определены как комбинированные, несущие и пуховые (типичные и модифицированные), а также контурные лучи. И до сих пор лишь в одной известной нам работе (Dey *et al.*, 2021) упомянуты комбинированные бородки с типичными пуховыми лучами. Сведения об адаптивном и диагностическом значении таких бородок и образующих их элементов не были систематизированы, поскольку отсутствовала инвентаризация и детальное описание этих перьевых структур.

Одной из основных функций покровных перьев является термоизоляционная, которая обеспечивается пуховыми частями бородок, несущими пуховые лучи. Другая важная функция покровных перьев состоит в противостоянии механической нагрузке, что вменяется, прежде всего, контурным лучам, снабженным скрепляющими элементами для сохранения плотности оперения. Другими словами, контурные структуры КБт и КБм способствуют плотности оперения, а пуховые осуществляют преимущественно функцию термоизоляции. Компромиссную задачу выполнения двойственных адаптивных требований (термоизоляция и плотность/жесткость оперения) решают все пуховые компоненты перьев и также ДП и ПП. Так, у некоторых Phasianidae (*Tetrao urogallus*, *Lyrurus tetrrix*, *Tetrastes bonasia* и *Lagopus* spp.), обитающих в субарктических областях, а также у тундряной куропатки (*Lagopus mutus*) отмечены сезонные вариации в размере ДП (Lonnberg, 1927; Salomonsen, 1939), что указывает на термоизоляцию, как основную функцию ДП и ПП. На первичность термоизолирующей функции пуховых образований указывает и то, что у распространенных в южных регионах видов отсутствуют МЛ, и комбинированные бородки развиты слабо. У Charadriiformes в группах Scolopacidae, Charadriidae, Haematopodidae и Glareolidae хорошо развиты все пуховые образования, в частности, ДП и ПП (<https://www.featherbase.info/uk/home>; <https://www.federn.org>).

Пуховую вставку с МЛ в контурную часть опахала можно определить, как облегченное ДП или ПП. МЛ отходят билатерально как от стержня бородки, так и от стержня пера. Соответственно, мы определяем их как бородочные и как стержневые (rachidial modified barbules) (Perremans, 1990) (рис. 2а, б). Смысл выхода опахальцев МЛ на вентральную сторону опахала, в частности, у Corvidae, видимо, также обусловлен необходимостью усиления термоизоляционных свойств опахала. Сохранению тепла способствует не только пуховая структура МЛ, но и многослойность перекрещивающихся пуховых МЛ, обеспечивающая увеличение толщины оперения.

Несмотря на пуховую природу, стержень МЛ достаточно жесткий. Жесткие лучи удерживают оперение птицы от слипания и позволяют циркулировать воздушной прослойке. В изученных покровных перьях птиц разных таксонов, пуховая часть занимает от двух третей площади опахала и более, а МЛ могут быть слабо развиты или их нет вообще. МЛ присутствуют преимущественно на опахалах с достаточно хорошо выраженной контурной частью. Располагаясь билатерально в центре контурной части пера, область МЛ не прикрывается соседними перьями и соответственно не подвергается интенсивному обнашиванию.

Важно, что структура МЛ видна невооруженным глазом и может быть использована в качестве таксономического признака при отсутствии специального оборудования, что особенно удобно для изучения видов с крупными перьями. Однако необходимо отметить, что разные типы этих структур могут встречаться в оперении одной и той же особи, а также в близкородственных и в неродственных группах, и пока мы не знаем, какие это группы. Тем не менее, одновременное наличие у некоторых групп птиц ДП или ПП и МЛ, а также разные их сочетания в перьях птиц из разных семейств, вполне могут быть показателями таксономического статуса при использовании в комплексе с другими птицологическими признаками в общей системе идентификационного ключа. Примером могут служить представители ряда семейств Charadriiformes (Силаева, 2019).

КБт не несут ярко выраженных диагностических признаков, их структуры сходны в разных таксонах. Тем не менее, отличаются размеры пуховых и контурных частей КБт, форма и структура бородок. По ним можно установить птерилии, на которых располагались изучаемые перья, а также различия внутри групп перьев, например, маховых и рулевых.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наличие, строение и сочетание теперь уже известных нам трех типов бородок (пуховой, контурной и комбинированной) позволяют идентифицировать таксон, к которому принадлежит птица. Следует подчеркнуть, что пуховые компоненты пера у представителей подавляющего большинства таксонов птиц не изучены. Более детальные исследования необходимы для выяснения распределения и встречаемости разных сочетаний пуховых компонентов. Необходимы дальнейшие исследования на большем материале для обеспечения статистической достоверности выводов по перьям разных птерилий одного вида и птерилий разных групп видов. Остается неизвестной связь между наличием или отсутствием дополнительного пера/пупочного пуха и присутствием в перьях типичных комбинированных бородок и модифицированных

комбинированных бородок; непонятен также принцип структурирования комбинированных бородок и областей модифицированных лучей.

Исследован большой перьевой материал, однако он недостаточен для выявления закономерностей наличия или отсутствия пуховых компонентов. Проанализированы только основные птерилии; изучено разное и недостаточное количество особей по каждому виду, и неполно представлено и разное количество видов одного семейства. Необходимо исследование большего статистического материала для сравнения между собой разных таксонов по принципу наличия пуховых компонентов. Проведение такого крупномасштабного исследования и анализа выходит за рамки одной статьи и изначально не входило в наши планы. Основной целью на первом этапе была констатация наличия и описание пуховой структуры модифицированных комбинированных бородок, и эта цель была достигнута: на настоящий момент удалось выявить этот пуховой компонент в большом количестве отрядов, а точнее — в 7 (37%) из 19 изученных нами отрядов.

Для идентификации птерилий требуется подробное изучение и сопоставление структур типичных комбинированных бородок. Для выявления закономерности сочетания контурных и пуховых структур типичных комбинированных бородок (билатеральные полосы и/или конусы, их симметричность) необходима статистика по соотношению размеров контурных и пуховых участков типичных комбинированных бородок. Это направление птинологических исследований представляется нам перспективным, так как его результатом могут стать находки дополнительных важных диагностических признаков в структуре оперения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Микроструктурные исследования перьев проведены с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Инструментальные методы в экологии” при ИПЭЭ РАН. Авторы благодарят за помощь в проведении исследования и подготовке статьи сотрудника Зоологического музея МГУ Я.А. Редькина, а также сотрудников ИПЭЭ РАН Ю.А. Богданову, Д.О. Заикину, К.С. Кузьмину и А.В. Подзолкову.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Государственного задания Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН “51. Экология организмов и сообществ”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо материалов исследований с участием людей и животных в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Войткевич А.А. Перо птицы (Морфология, развитие, линька и нейрогормональная регуляция). М.: АН СССР. 1962. 288 с.
- Ильичев В.Д. Исследование тонкой структуры пера с помощью прибора ФМН-2 // Зоол. журн. 1963. Т. 42. Вып. 10. С. 1584–1585.
- Коблик Е.А., Архипов В.Ю. Фауна птиц стран Северной Евразии в границах бывшего СССР: списки видов // Зоологические исследования. 2014. № 14. 171 с.
- Силаева О.Л., Горохова Ю.А. Дополнительные пуховые образования пера у птиц отряда Ржанкообразных (Charadriiformes) // Международный научно-исследовательский журн. 2017. Т. 57. Вып. 3. С. 20–26.
- Силаева О.Л., Гуменюк Г.В. Особенности структуры пера некоторых Врановых видов птиц // Вестник МОАЭБП. 2008. Т. 12. Вып. 5. С. 133–140.
- Силаева О.Л. Система диагностических признаков покровных перьев птиц отряда Ржанкообразных // Известия РАН. Серия биологическая. 2019. № 4. С. 1–11. DOI: 10.1134/S1062359019040125
- Силаева О.Л., Ильичев В.Д., Чернова О.Ф. Определитель птиц по перу и его фрагментам. Отряд Воробьинообразные (Passeriformes), Семейство Врановые (Corvidae). Саарбрюкен: LAP LAMBERT Academic Publishing. 2012. 316 с.
- Силаева О.Л., Ильичев В.Д., Чернова О.Ф., Вараксин А.Н. Определитель птиц по перу и его фрагментам. Отряды: Курообразные (Galliformes), Голубеобразные (Columbiformes), Рябкообразные (Pterocletiformes). М.: КМК Sci. Publ. 2013. 120 с. Компакт-диск. 91 с.
- Силаева О.Л., Чернова О.Ф., Вараксин А.Н. Определитель птиц по перу и его фрагментам. Отряд Гусеобразные (Anseriformes). М.: ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН. 2015. Компакт-диск. 270 с.
- Силаева О.Л., Чернова О.Ф., Букреев С.А., Вараксин А.Н. Определитель птиц по перу и его фрагментам. Отряд Ржанкообразные (Charadriiformes). М.: КМК Sci. Publ. 2018. 385 с.
- Чернова О.Ф., Ильищенко В.Ю., Перфилова Т.В. Архитектоника пера и ее диагностическое значение. Теоретические основы современных методов экспериментального исследования. М.: Наука. 2006. 100 с.

- Chandler A. C.* A study of the structure of feathers, with reference to their taxonomic significance // Univ. Calif. Pub. Zool. 1916. №13. P. 243–446.
- Dey P., Ray S. D., Sharma S. K., Pramod P., Singh R. P.* Identification of a unique barb from the dorsal body contour feathers of the Indian *Pitta brachyura* (Aves: Passeriformes: Pittidae) // The Journal of Threatened Taxa. 2021. V. 13. № 8. P. 19029–19039. <https://orcid.org/0000-0001-6486-958X>.
- Gill F., D. Donsker & P. Rasmussen (Eds).* IOC World Bird List (2024. V. 14.1). DOI: 10.14344/IOC.ML.14.1. <http://www.worldbirdnames.org/> (дата обращения – 18.02.2024). <https://www.featherbase.info/uk/home> (дата обращения – 20.08.2023). <https://www.federn.org> (дата обращения – 20.08.2023).
- Lonnberg E.* Einige Beiträge zur Kenntnis unserer Waldhühner, Tetraonidae [Some contributions to the knowledge of our forest fowls, Tetraonidae] // Jour.f. Ornith. 1927. № 75. P. 579–596.
- Lucas A. M., Stettenheim P. R.* Avian Anatomy: Integument. Washington: US Dept. Agricult. Parts I. 1972. 340 p.
- Nitzsch Chr. L.* System der Pterilographie [System of Pterilography] /Chr. L. Nitzsch. Halle. 1840. 264 p.
- Perremans K.* External surface structures of rachis, rami and rachidial barbules of feathers and their potential for determination purposes//20th Meeting Bird Strike Committee Europe. Helsinki. 1990. P. 21–30.
- Salomonsen F.* Moults and sequences of plumages in the rock ptarmigan (*Lagopus mutus* (Montin)) / Salomonsen F. // Danske Naturhist. For., Copenhagen Vidensk. Meddel. 1939. №103. 491 p.
- Spearman R. I., Hardy J. A.* Integument, in King AS, Mc Lelland J (eds): Form and Function of Birds. London, UK, Academic Press. 1985. V. 3. P.1–56.
- Stettenheim P. R.* The Integumentary Morphology of Modern Birds // An Overview AMER. ZOOL. 2000. 40. P. 461–477.
- Ziswiler V.* Die Afterfeder der Vögel. Untersuchungen zur Morphogenese und Phylogenese des sogenannten Afterschaftes [The afterfeather of the birds. Investigations on the Morphogenesis and Phylogenesis of the so-called Afterschaft] / V. Ziswiler // Zool. Jahrb. Abt. F. Anat. Bd. 1962. №80. P. 245–308.

The presence and microstructure of down compartments of feathers in representatives of nineteen orders of birds (Aves)

O. L. Silaeva, S. A. Bukreev, R. M. Khatsaeva[#]

*A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

[#]E-mail: r.khatsaeva@mail.ru

An inventory and description of the occurrence of the first studied down structures of feathers: combined barbs with typical down barbules and combined barbs with modified down barbules are carried out. The occurrence and distribution of these structures, as well as additional feather and umbilical barbs in different plumage pterygia of 441 birds of 129 species belonging to 19 orders were noted; 3330 feathers have been studied. Downy structures in the orders Charadriiformes and Passeriformes have been studied in most details. In the order Charadriiformes the families and their constituent species differ in the presence or absence of modified barbules. In the feathers of representatives of the order Passeriformes an additional feather/umbilical barbs and modified barbules do not occur in one of the same feathers. In the plumage of representatives of all studied taxa combined barbs with typical down barbules were found, which are present to a greater extent in the cover feathers, and to a lesser extent, on the flight and tail feathers. Combined barbs with modified down barbules are not so widespread in the plumage of the studied taxa and they are present only on the cover feathers. Among the studied orders the additional feather and umbilical barbs are absent in the plumage of Coraciiformes and Upupiformes. The adaptive and diagnostic significance of the studied downy structures is noted. The main function of all downy structures is thermal insulation, while maintaining the rigidity of plumage, preventing its sticking and sealing can be called secondary. The presence in some groups of birds on one and the same feather of an additional feather/umbilical barbs and modified barbules, as well as their various combinations, can be used as a taxonomic sign in combination with other ptylological characters. The presence of downy formations, their shape, structure, size and other features may indicate pterygia within some taxonomic groups of feathers. Along with visual inspection of feathers, light and electron microscopy was also used.

Keywords: ptylology, feather downy structures, feather microstructure, identification by feather structure.

УДК 599.325:591.32

ДИНАМИКА ПРОДВИЖЕНИЯ КОРМА ПО ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОМУ ТРАКТУ У НОЧНОГО ГРЫЗУНА *MERIONES CRASSUS* КАК РЕАКЦИЯ НА РИТМ КОРМОВОЙ АКТИВНОСТИ

© 2024 г. Е. И. Наумова^{*,*}, Г. К. Жарова*, Т. Ю. Чистова*

^{*}Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Ленинский просп., 33, Москва, 119071 Россия

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

Поступила в редакцию 26.03.2024 г.

После доработки 06.04.2024 г.

Принята к публикации 07.04.2024 г.

На примере ночного грызуна *Meriones crassus* исследована зависимость продвижения корма по пищеварительному тракту (ПТ) от кормовой активности. Две группы песчанок содержали в лабораторных условиях при искусственном освещении с фотопериодом 12:12 С:Т в течение 36 ч. Группы обозначили как «дневную» и «ночную» в зависимости от преобладания светлого, или темного времени в течение эксперимента. Среднее время задержки маркеров в желудке в этих группах составило 20 и 30 ч соответственно. Кинетика содержимого изменялась в зависимости от конкретного времени введения маркеров и уровня насыщения грызунов кормом. В светлый период суток уже через 2 ч начинается последовательная эвакуация из желудка поступивших в ПТ маркеров, а ночью, в период более высокой кормовой активности часть корма, расположенная в своде желудка и в слепой кишке, задерживается здесь на более длительное время. В «дневной» группе к концу эксперимента было выведено 84% маркеров, а в «ночной» группе около 55 %.

Ключевые слова: грызуны, пищеварительный тракт, многократное мечение корма, кинетика пищевых волокон, кормовая активность

DOI: 10.31857/S1026347024050094, **EDN:** uleewv

В течение нескольких десятилетий скорости продвижения корма по пищеварительному тракту (ПТ) млекопитающих, как важной составляющей физиологии пищеварения, уделялось достаточно много внимания. Полученные результаты, включая методы исследования, неоднократно были обобщены и проанализированы (Warner, 1981; Stevens, Hume *et al.*, 1993; Hume *et al.*, 1993; Sakaguchi, 2003; Clauss *et al.*, 2007, 2013; Müller *et al.*, 2013). Рассмотрены многие факторы, влияющие на время экспозиции корма в пищеварительном тракте, такие как размер тела животных, морфология ПТ, тип ферментации, уровень потребления и качество корма, а также методические недостатки, снижающие надежность результатов.

Исследование кинетики твердой фракции корма у нескольких видов полевок и песчанок с использованием метода многократной маркировки корма (Наумова, Кучерук, 1996; Жарова и др., 2002, 2010; Наумова и др., 2007, 2024) позволило выяснить важные нюансы циркуляции содержимого у растительноядных грызунов с малыми размерами тела, не регистрируемые с помощью однократной

маркировки корма. Была обнаружена важная с функциональной точки зрения особенность, которая заключается в неравномерности продвижения содержимого, а именно, нарушении последовательности выведения маркеров, поступавших в ПТ через определенные промежутки времени. Это нарушение обусловлено спецификой сбора и поглощения кормовых растений мелкими фитофагами. Размерные ограничения исключают возможность одновременного потребления мелкими грызунами достаточного количества бедной растительной пищи. Независимо от типа кормовой активности грызуны часто пополняют кормом желудок, что сопряжено с быстрой эвакуацией содержимого и его быстрым дальнейшим прохождением по ПТ. Подобная ситуация характеризуется большими колебаниями уровня наполнения желудка от которого зависит локализация маркированного корма и, соответственно, динамика его прохождения по ПТ. В этом заключается одна из причин высокой изменчивости кинетики содержимого ПТ, продемонстрированная на примере дневной песчанки (Наумова и др., 2024).

Для выяснения зависимости характера продвижения корма по ПТ от ритма кормовой активности мы выполнили многократное мечение корма ночного грызуна *Meriones crassus* в разные фазы кормовой активности. Ранее мы исследовали несколько видов грызунов (полевок и песчанок) с круглосуточной кормовой активностью, а *M. crassus* – грызуны, потребляющие корм в основном ночью (Khokhlova *et al.*, 2005). Хотя в некоторых публикациях была отмечена зависимость скорости прохождения корма от уровня его потребления (Pei *et al.*, 2001; Clauss *et al.*, 2007;), метод однократного мечения не позволяет учесть ритм наполнения кормом желудка и слепой кишки, как и порядок выведения корма из них.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Песчанка Сундевала *Meriones crassus* – ночной семеноядный грызун, основным кормом которого служат семена, а также листья пустынных растений как источник влаги. Мы провели две серии опытов по маркировке корма песчанок в дневное и ночное время. Животных кормили свежесобранной начинающей плодоносить травой *Salsola tetrandra*. В каждой экспериментальной группе было задействовано по 6 взрослых не размножающихся песчанок обоих полов, рожденных в неволе. Животных содержали в клетках поодиночке при искусственном освещении с равным соотношением светлого и темного времени суток (С:Т = 12:12). Работа выполнена в лаборатории университета им. Бен-Гуриона.

Для детализации путей продвижения твердых фракций корма мы применили пяти- и семикратное мечение корма инертными маркерами. В качестве инертного маркера волокнистой фракции корма использовали тонкую пластиковую пленку разных цветовых оттенков. Метод детально описан в предшествующих публикациях (Наумова, Кучерук, 1996; Жарова и др., 2002, 2010; Наумова и др., 2007; 2024). Каждая порция маркера состояла из смешанных с приманкой мелких кусочков пленки, общее количество которых в ПТ и экскрементах подсчитывали в конце эксперимента и принимали за 100 %. Время поедания и длительность экспозиции маркеров в каждой экспериментальной группе песчанок приведено в табл. 1. В конце опытов анализировали количественное распределение маркеров в ПТ у умерщвленных грызунов. ПТ и отдельно желудок и слепую кишку взвешивали на электронных весах с точностью до 0.001.

Среднее время задержки корма (*MRT*) в ПТ рассчитывали по формуле (Warner, 1981):

$$MRT = \frac{\sum_{i=1}^n m_i t_i}{\sum_{i=1}^n m_i}$$

Таблица 1. График поступления маркеров в ПТ

Группа песчанок	№ маркера	Время поедания маркера	Длительность экспозиции маркера (ч)
1 (дневная)	1	12:00	36
	2	18:00	30
	3	24:00	24
	4	9:00	15
	5	16:00	8
	6	18:00	6
	7	22:00	2
2 (ночная)	1	20:00	36
	2	8:00	24
	3	20:00	12
	4	2:00	6
	5	5:00	3

где m_i – количество частиц маркера в экскрементах, выделенных за время t_i после поедания маркированной приманки, n – количество дефекаций за время полного выведения маркера. *MRT* рассчитывали отдельно по каждому маркеру. Аналогично рассчитывали время задержки корма в желудке и слепой кишке. При этом за m_i принимали количество фрагментов маркера, прошедшее через данный орган (то есть, обнаруженных в ПТ позади желудка или слепой кишки и экскрементах). За t_i принимали время экспозиции маркера в желудке, или слепой кишке.

Обобщенные диаграммы кинетики содержимого в ПТ по отдельным органам и в экскрементах построены на основании данных о распределении маркеров в конце опыта у умерщвленных животных. Полученные данные обработаны методами непараметрической статистики (Statistica 12).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Длительность экспериментов составила 36 ч, в течение которых грызуны получали маркированные приманки в разные фазы активности и разное время суток. Экспериментальные группы различались по суммарной длительности светлого и темного периодов и времени начала экспериментов. Группу, в которой первый маркер был дан зверькам в 12:00, а соотношение светлого и темного времени составило 20:16, мы обозначили как «дневную». Группу, в которой начало опыта пришлось на 20:00, а соотношение светлого и темного времени в эксперименте составило 12:24, мы обозначили как «ночную».

Суммарное время задержки маркеров в ПТ

Длительность экспериментов не позволила выяснить полное время задержки корма в ПТ песчанки Сундевала. В первом опыте (дневная группа), охватившем два периода светлого времени суток, и одну ночь, через 36 ч из ПТ вышло более 80% маркера, поступившего в ПТ в полдень (рис. 1). Во втором опыте (ночном), охватившем два периода ночной активности и один дневной, через 36 ч из ПТ эвакуировалось 55% маркированной приманки, съеденной песчанками вечером в 20:00, а маркер, пролежавший в ПТ 24 ч, съеденный утром в 8:00, был выведен на 65%.

Первые частицы маркеров (около 5%) были зарегистрированы в экскрементах дневной группы песчанок через 8 ч экспозиции (с 16:00), а в ночной группе первые фрагменты маркеров (менее 5%) были отмечены через 12 ч экспозиции в ПТ (с 20:00). Среднее время задержки маркеров

Таблица 2. Среднее время задержки маркеров в желудке и кишечнике

Группа	MRT (ч)		
	Общее	Желудок	Слепая
Дневная	19 (15–26)	20 (16–30)	20 (16–29)
Ночная	—	30 (27–35)	28 (23–35)

в желудке и кишечнике заметно различались в двух группах песчанок (табл. 2).

Продвижение маркированного корма по отдельным органам ПТ в дневной группе

Маркированный корм, поступавший в желудок песчанок в полдень, выходил из желудка и достигал слепой кишки относительно быстро. Через 2 ч после

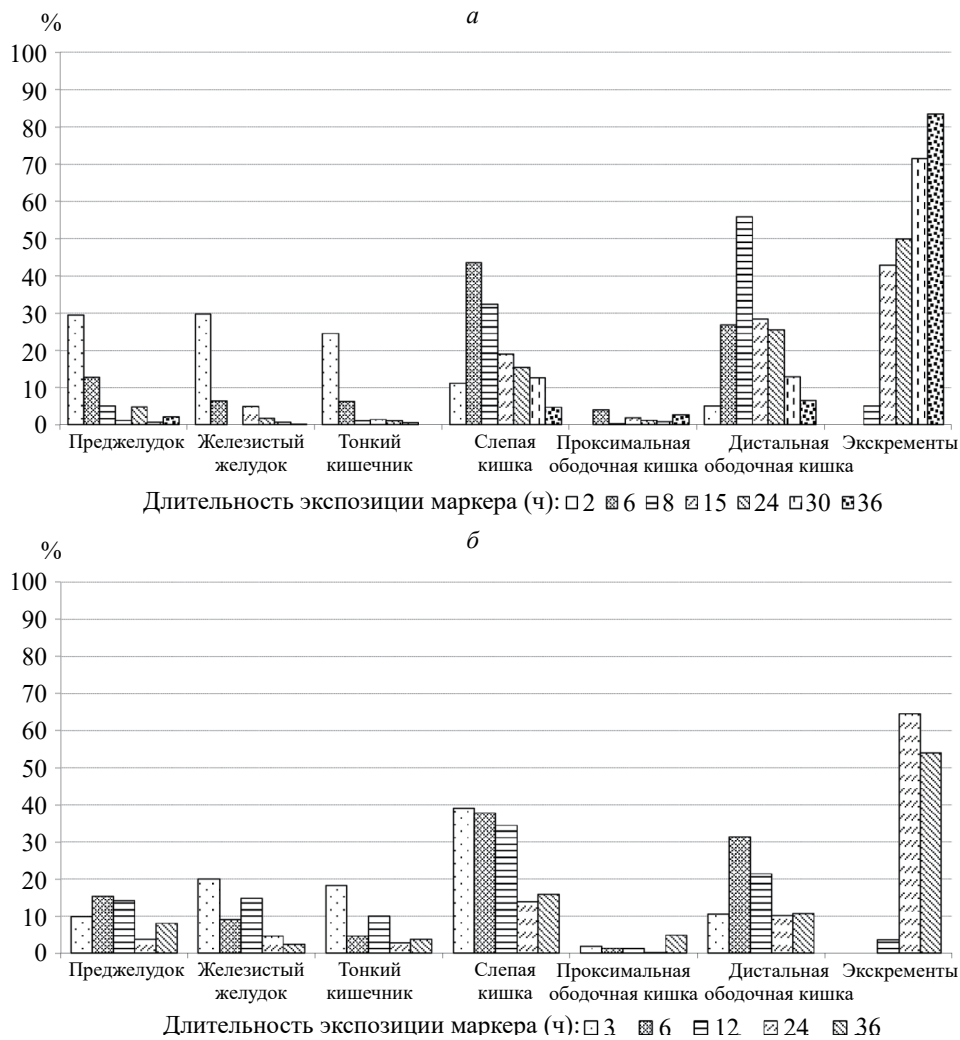


Рис. 1. Содержание маркеров (%) с разной длительностью экспозиции в каждом органе ПТ по результатам вскрытия в дневной (а) и ночной (б) группах песчанок.

потребления приманки из желудка песчанок дневной группы эвакуировалось около 40 % маркера (рис. 1а), а оставшаяся доля распределилась между преджелудком и железистой частью примерно поровну. В это время около 10% маркера уже достигло слепой кишки. Дальнейшее мечение показало последовательное прохождение вводимых в ПТ маркеров и их задержку в слепой кишке, а большая часть оставшихся частиц маркеров задержалась в преджелудке. При самой длительной экспозиции (24, 30 и 36 ч) в желудке все же оставались следовые количества маркеров. Через 6–8 ч в слепой кишке скопилось до 45% маркеров, а через 8 ч началось их активное выведение с экскрементами. Через 24 ч в слепой кишке еще оставалось более 15 % маркеров, а через 36 ч – около 5%. В проксимальной части ободочной кишки маркеры почти

не задерживались. В дистальной части ободочной кишки наибольшая концентрация маркеров наблюдалась при 8-часовой экспозиции (более 50%).

Продвижение маркированного корма по отдельным органам ПТ в ночной группе

Первый маркер, пролежавший в ПТ более суток, песчанки получили в 20:00. Хотя через 36 ч экспозиции в желудке осталось еще около 10% маркера, поступившие последующие маркеры не задерживались в желудке надолго (рис. 1б). Через 3 ч здесь осталось 30% маркера, а в слепой кишке было сконцентрировано около 40%. Маркеры с экспозицией в ПТ 6 и 12 ч (поступившие в желудок в темное время суток) до слепой кишки продвигались примерно также, как первый маркер. В желудке их содержание

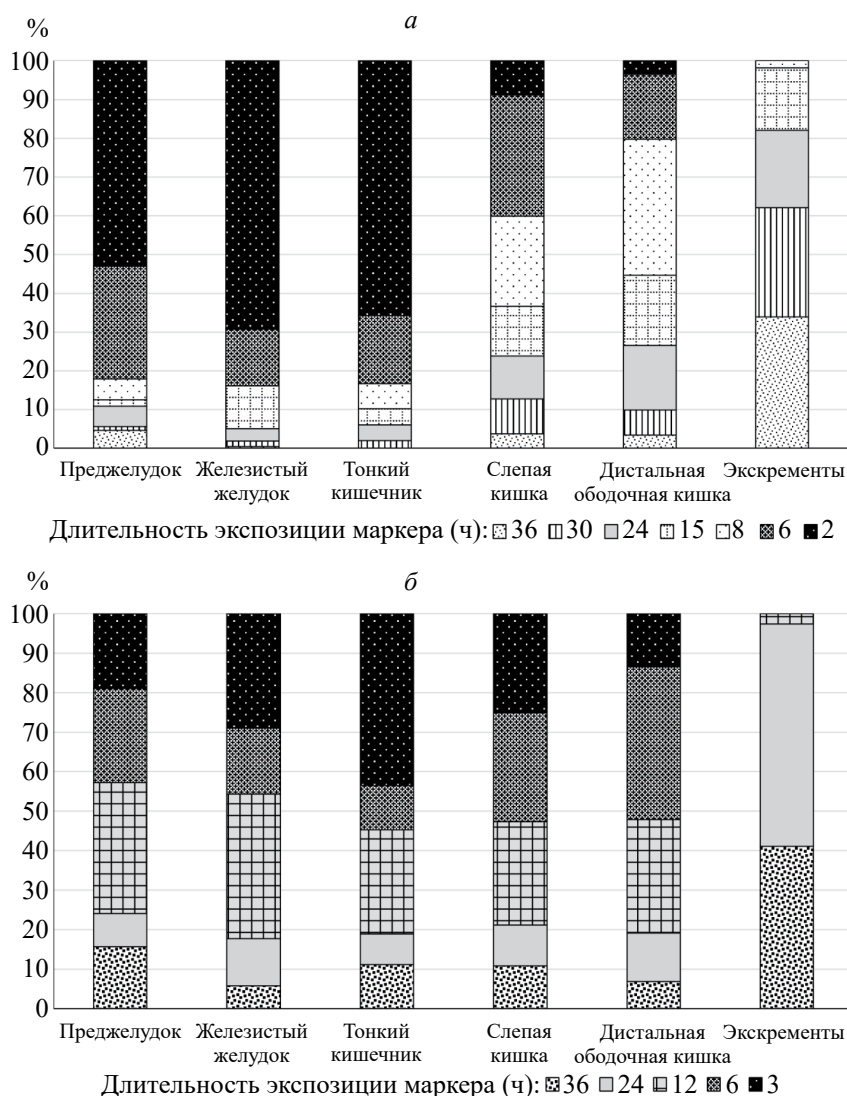


Рис. 2. Количественное соотношение маркеров (%) в разных отделах ПТ по завершении опыта в дневной (а) и ночной (б) группах песчанок.

составило около 20%, а в слепой кишке осело около 40%. В проксимальной части ободочной кишки маркеры не задерживались, а в дистальной части максимальной концентрации (30%) достиг маркер с 6-часовой экспозицией. Через 24 и 36 ч экспозиции в желудке и слепой кишке задержалось около 25 % всех маркеров.

Количественное соотношение маркеров в отдельных органах ПТ в зависимости от времени их поступления в желудок

Расчет количественного соотношения маркеров, поступивших в желудок в разное время, и задержавшихся в ПТ до конца экспериментов, позволил зарегистрировать два варианта распределения корма (рис. 2) в зависимости от длительности экспозиции и времени поступления маркеров в ПТ. При этом проявились четкие различия между характером локализации маркированных порций корма, съеденных в разное время суток. В обеих экспериментальных группах следует отметить быстрое поступление части маркеров в слепую кишку (через 2–3 часа) и длительную задержку (на весь экспериментальный период) части маркированного корма в преджелудке. Важное различие между группами заключается в длительности задержки корма, съеденного на разных стадиях кормовой активности.

Сравнительный анализ количественного содержания маркеров в желудке, слепой кишке и экскрементах выявил значительные различия в продвижении маркеров по ПТ в зависимости от времени их поступления в желудок. (табл. 3). Маркеры, поступившие в ПТ в утренние

и дневные часы, длительность экспозиции которых составила около 13 и 36 ч, выводились из желудка и слепой кишки гораздо быстрее, чем маркеры с такой же длительностью экспозиции, но поступившие в ПТ в вечернее время. Содержание маркеров, поступивших в ПТ в светлое время суток, с длительностью экспозиции 13 и 36 ч, в экскрементах было значительно выше, чем поступивших в ПТ в темное время. В остальных случаях различия не были достоверными, но при анализе продвижения маркеров с самой короткой экспозицией в ПТ (2–3 ч), было обнаружено, что в желудке застаивается больше маркеров, поступивших в желудок вечером (в 22:00), в начале кормовой активности, чем маркеров, поступивших в ПТ в конце кормовой активности (в 5:00). В слепой кишке наблюдается противоположная ситуация – маркеры, поступившие в ПТ в начале кормовой активности, скапливаются в ней в большей степени, чем поступившие в ПТ в конце кормовой активности (рис. 3).

Взаимосвязь кинетики прохождения маркеров, кормовой активности и наполнения ПТ кормом

В исследовании кинетики содержимого дневной песчанки (грызуна с круглосуточной активностью) приведены примеры зависимости продвижения корма от степени наполнения ПТ (Наумова и др., 2024). Эти различия были связаны с частыми неритмичными поступлениями свежего корма в желудок в течение суток. Подобная ситуация достаточно подробно разобрана на примере

Таблица 3. Сравнительный анализ зависимости количественного содержания маркеров от времени их поступления в ПТ

Локализация маркера	Длительность экспозиции маркера (ч)	Время поступления маркера		Количественное содержание маркера (%)		Р
Желудок	2 – 3	22:00	5:00	59.27	29.99	0.083
	6	18:00	2:00	19.26	24.55	0,635
	12 – 15	9:00	20:00	6.22	29.05	0.0001*
	24	8:00	24:00	8.33	6.65	0.642
	36	12:00	20:00	2.41	10.68	0.007*
Слепая кишка	2 – 3	22:00	5:00	11.11	39.11	0.061
	6	18:00	2:00	43.59	37.89	0.434
	12 – 15	9:00	20:00	18.99	34.51	0.017*
	24	8:00	24:00	13.95	15.48	0.517
	36	12:00	20:00	4.81	15.89	0.028*
Экскременты	12 – 15	9:00	20:00	42.94	3.70	0.001*
	24	8:00	24:00	64.54	49.97	0.07
	36	12:00	20:00	83.48	54.00	0.035*

Примечание. *Различия статистически достоверны

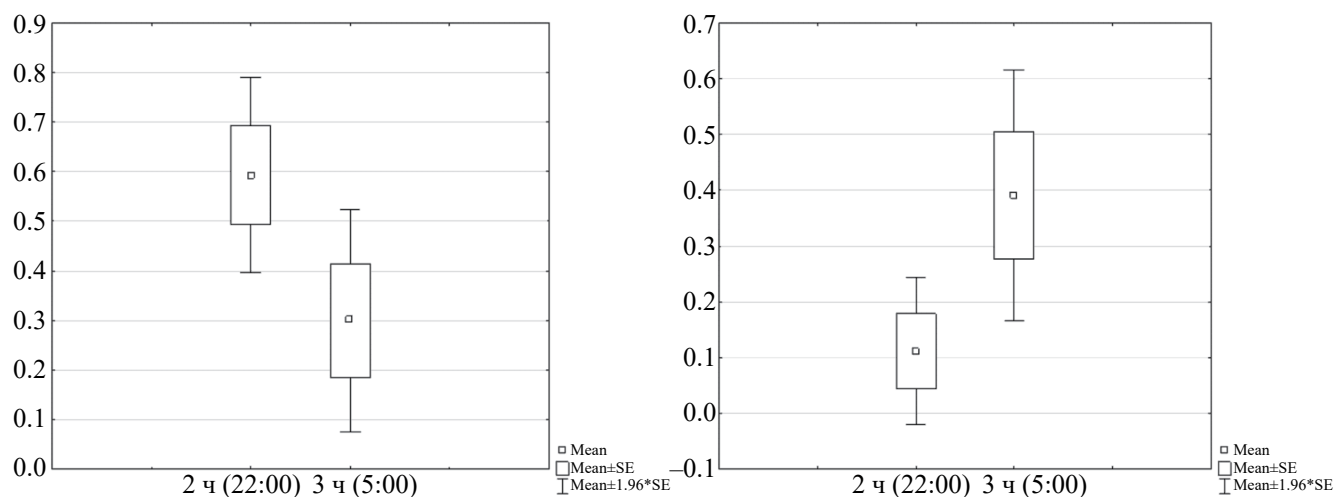


Рис. 3. Относительное содержание маркеров в желудке (а) и в слепой кишке (б), поступивших в ПТ в разное время суток.

большой песчанки (Наумова, Кучерук, 1996). Вновь поступающая доза пищи заходит в свод желудка и вытесняет к периферии (к большой кривизне) уже находившееся там содержимое. При активной кормежке уже оккупировавший свод корм не успевает продвинуться в тонкий кишечник, и часть его застревает надолго в области свода. А в заполненном желудке новый корм локализуется в пилорической части желудка.

У ночной песчанки Сундевала эта особенность также проявляется, но на фоне заметного общего снижения кормовой активности в светлое время суток, которое заключается в сокращении количества и длительности эпизодов поедания корма (Khokhlova *et al.*, 2005). Следовательно, у песчанки Сундевала маркировка корма в дневные часы осуществлялась на фоне слабого заполнения желудка. Поэтому темпы продвижения отдельно взятых маркеров, пролежавших в ПТ сходные отрезки времени, но поглощенных зверьками в дневное, или ночное время, существенно различаются. Например, маркеры со сходной экспозицией (2–3 ч), но поступившие в желудок в разное время, выводились из него с разной интенсивностью. Маркер, съеденный в начале кормовой активности (22:00), вывелся из желудка на 40%, а поступивший в конце кормовой активности – на 70%. Маркер с экспозицией 36 ч, поступивший в желудок в полдень (дневная группа), практически вывелся из ПТ, а маркер, поступивший в начале кормовой активности в 20 ч еще заметен в небольших количествах во всех отделах ПТ. В слепой кишке наблюдалась обратная ситуация: в начале кормовой активности здесь находилось лишь 10% маркера, а в конце кормовой активности в ней было сконцентрировано около 40% маркера.

Пути и скорость продвижения разных маркеров у песчанки Сундевала, с разной интенсивностью потребляющей корм днем и ночью, определяются характером заполнения ПТ кормом. При проведении маркировки в светлое время, когда кормовая активность снижена, маркер поступает в слабо наполненный желудок, и быстрее эвакуируется из него. В случаях ночного мечения при активной кормежке очередной маркер поступает в желудок, который в большой степени уже заполнен кормом. Поэтому значительная часть маркированного корма быстрее эвакуируется в тонкий кишечник, а свод желудка надолго остается занятым кормом, поступившим ранее. Отмеченные особенности продвижения содержимого согласуются с наполнением желудка и слепой кишки на разных стадиях потребления корма. В дневной группе на кормовую активность пришлось заметно меньше времени, чем в ночной, что отразилось на относительной массе ПТ – 7.02% и 11.48% массы тела соответственно. Тенденция к сопряженности показателей относительной массы органов и среднего времени задержки в них маркеров наблюдалась в большинстве рассмотренных случаев. Особенно заметно эта зависимость проявилась при сопоставлении времени задержки корма и массы желудка в темное время суток и массы слепой кишки в светлое время суток (рис. 4).

Таким образом, многократное мечение корма у грызунов позволяет визуализировать вариативность путей продвижения пищевой массы в ПТ, зависящую от режима кормовой активности. Помимо других, уже изученных факторов, влияющих на кинетику содержимого ПТ, таких как качество корма и уровень его потребления, кормовая активность может нарушить надежность получаемых результатов. Особенно это влияние

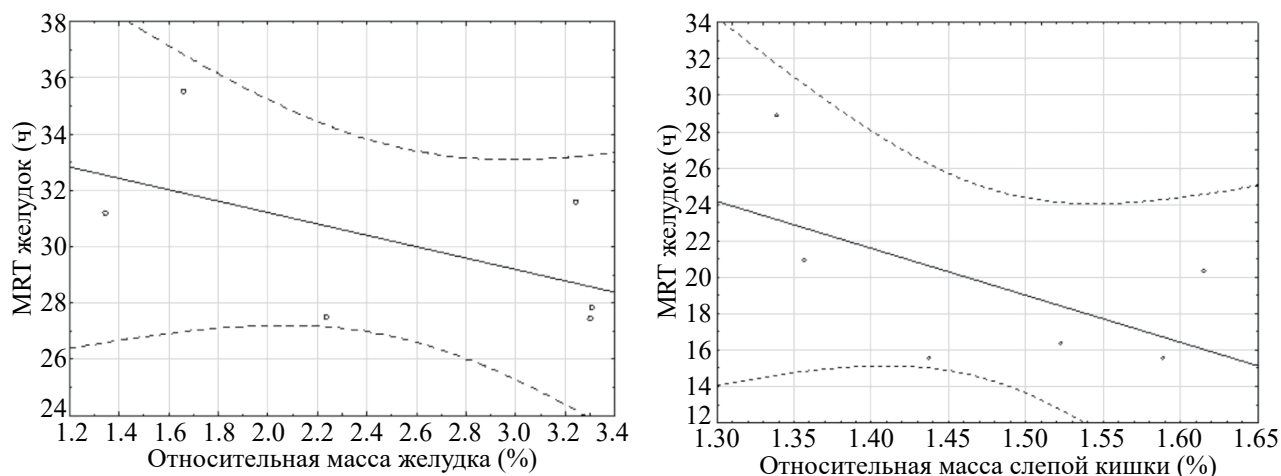


Рис. 4. Корреляция между относительной массой желудка и длительностью задержки в нем корма (а), $r = -0.5591$, и относительной массой слепой кишки и длительностью задержки в ней корма (б), $r = -0.5906$

может быть значительным у животных со сдвигом кормовой активности на светлое или темное время суток. Отмеченную зависимость следует учитывать при исследовании кинетики содержания у грызунов.

Авторы приносят глубокую благодарность израильским коллегам А. Дегену, И.С. Хохловой, Б.Р. Краснову и М. Каму, за предоставленный материал и организацию работы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Отсутствуют коммерческие, финансовые, личные и профессиональные факторы, которые могли бы создать конфликт интересов

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования на экспериментальных животных проводились в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных (Национальная академия, Вашингтон, округ Колумбия, 1996 г.), которое является основой документа «Директива 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Жарова Г.К., Наумова Е.И., Чистова Т.Ю., Нестерова Н.Г., Подтяжский О.И. Особенности прохождения пищи по пищеварительному тракту серых полевок // Докл. РАН. 2002. Т. 382. № 4. С. 1–3.
- Жарова Г.К., Чистова Т.Ю., Наумова Е.И. Особенности продвижения корма по пищеварительному тракту тамарисковой песчанки *Meriones tamariscinus* // Докл. РАН. 2010. Т. 435. № 4. С. 1–4.
- Наумова Е.И., Кучерук В.В. Экспериментальное исследование скорости и динамики продвижения разных кормов по пищеварительному тракту большой песчанки // Изв. РАН. Сер. биол. 1996. № 6. С. 716–724.
- Наумова Е.И., Жарова Г.К., Чистова Т.Ю. Исследование продвижения корма по пищеварительному тракту полевок методом многократного введения пластиковых маркеров // Зоол. журн. № 6. 2007. № 6. С. 739–750.
- Наумова Е.И., Жарова Г.К., Чистова Т.Ю. Кинетика пищевых волокон у дневной песчанки: значение изолирующих структур пищеварительного тракта и качества корма // Изв. РАН. Сер. биол. 2024. № 4.
- Clauss M., Schwarm A., Ortmann S., Streich J., Hummel J. A case of non-scaling in mammalian physiology? Body size, digestive capacity, food intake, and ingesta passage in mammalian herbivores // Comp. Biochem. Physiol. A. 2007. V. 148. P. 249–265. DOI:10.1016/j.cbpa.2007.05.024
- Clauss M., Steuer P., Muller D.W.H., Codron D., Hummel J. Herbivory and bodysize: Allometries of diet quality and gastrointestinal physiology, and implications for herbivore ecology and dinosaur gigantism // PLoS ONE. 2013. 8 (10), e68714. DOI: 10.1371/journal.pone.0068714
- Hume I.D., Morgan K.R., Kenagy G.J. Digesta retention and digestive performance in sciurid and microtine

- rodents: effect of hindgut morphology and body size // *Physiol. Zool.* 1993. V. 66. № 3. P. 396–411.
- Khokhlova I.S., Krasnov B.R., Kuznetsov V., Sartor C.E., Zan M., Salek L., Ghazaryan L., Kam M., Degen A.A. Dietary intake and time budget in two desert rodents: a diurnal herbivore, *Psammomys obesus*, and a nocturnal granivore, *Meriones crassus* (*Lagurus lagurus*) // *Mammalia*. 2005. V. 69. № 1. P.1–11.
- Müller D.W.H., Codron D., Meloro C., Munn A., Schwarm A., Hummel J., Clauss M. Assessing the Jarman–Bell Principle: Scaling of intake, digestibility, retention time and gut fill with body mass in mammalian herbivores // *Comp. Biochem. Physiol. A*. 2013. V. 164. P. 129–140.
- Pei Y.-X., Wang D.-H., Hume I. Effect of Dietary Fibre on Digesta Passage, Nutrient Digestibility and Gastrointestinal Morphology in the Granivorous Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*) // *Physiol. Biochem. Zool.* 2001. V. 74. № 5. P. 742–749.
- Sakaguchi E. Digestive strategies of small hindgut fermenters // *Animal Sci. J.* 2003. V. 74. P. 327–337.
- Stevens C.E., Hume I.D. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients // *Physiol. Rev.* 1998. V. 78. № 2. P. 393–427.
- Warner A.C.I. Rate of passage of digesta through the gut of mammals and birds // *Nutr. Abstr. Rev.* 1981. Ser. B51. P. 789–820.

Dynamics of food passing through the digestive tract in the nocturnal rodent *Meriones crassus* as a response to the rhythm of feeding activity

E. I. Naumova*, G. K. Zharova, T. Yu. Chistova

Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

**E-mail: einaumova@gmail.com*

The dependence of the food passing through the digestive tract (DT) on the feeding activity in the nocturnal rodent *Meriones crassus* was studied. Two groups of gerbils were housed in laboratory under artificial lighting at a photoperiod of 12:12 L:D for 36 hours. Groups were named “day” (L:D=20:16) and “night” (L:D=12:24) according to predominance light or dark time during the experiment. The average retention time of markers in the stomach in these groups was 20 and 30 hours, respectively. The kinetics of the contents changed depending on the specific time of consumption of the markers and the saturation level of the rodents with food. During the daylight hours, sequential evacuation of markers entering the DT begins from the stomach after 2 hours, and at night, during a period of higher feeding activity, part of the food located in the fornix of the stomach and in the caecum stays here for a longer time. In the “day” group, by the end of the experiment, 84% of the markers were removed from DT, and in the “night” group, about 55%.

Keywords: rodents, digestive tract, multiple marking of food, kinetics of dietary fiber, feeding activity

УДК 591.69-72/75-319.4:574.5

ПРИУРОЧЕННОСТЬ МИКСОСПОРИДИЙ РОДА *KUDOA* MEGLITSCH, 1947 РЫБ МИРОВОЙ ФАУНЫ К ОБИТАНИЮ НА ОПРЕДЕЛЕННЫХ ГЛУБИНАХ

© 2024 г. В. М. Юрахно

Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН»,
пр. Нахимова, 2, Севастополь, 299011 Россия

E-mail: viola_taurica@mail.ru

Поступила в редакцию 24.10.2023 г.

После доработки 26.12.2023 г.

Принята к публикации 27.12.2023 г.

В настоящей работе приведены первые сведения о возможной встречаемости миксоспоридий рода *Kudoa* в рыбах Мирового океана и, в нескольких отдельных случаях, в связанных с ним пресноводных водоемах, на разных глубинах. Впервые дан анализ теоретически предполагаемой приуроченности *Kudoa* к разным глубинам обитания их хозяев-рыб Мировой фауны. Выявлено, что в прилегающих к берегам зонах шельфа могут быть встречены все виды миксоспоридий рода *Kudoa*, из которых 90 видов (70.8 % от общего числа) встречаются исключительно в шельфовой зоне, а хозяева 50 видов *Kudoa* (39.4 %) обитают в самой мелководной ее части (до 50 м). На глубинах от шельфа до 500 и до 1000 метров могут быть найдены 16 видов (12.6 %) и 14 видов (11 %) данного рода, соответственно. На глубинах до 1500 и 3000 м теоретически могут быть встречены от 1 до 3 видов Кудоа, что составляет от 0.8 до 2.4 % от всех известных представителей этих паразитов.

Ключевые слова: Muxosporea, *Kudoa*, Kudoidae, рыбы, глубина обитания, Мировая фауна

DOI: 10.31857/S1026347024050104, **EDN:** ulcbasa

Глубина водоема является одним из важных экологических факторов внешней среды (среды второго порядка), оказывающих существенное влияние на зараженность рыб миксоспоридиями. Это напрямую связано с тем, что расселительная стадия данных паразитов — их споры — могут находиться довольно продолжительное время в природной среде, зачастую обладая различными приспособлениями к парению в толще воды и имеющими различную скорость опускания. Известно, что в ряде случаев споры могут быть приурочены к определенным водным слоям, но рано или поздно они все же опускаются на дно и накапливаются в грунтах, среди которых наиболее благоприятными для этого являются илы, легко взмучивающиеся при штормах в случаях небольших глубин, отчего споры вновь попадают в воду и с грунтом при приеме пищи — в новых хозяев. Так, нами ранее на примере черноморских видов миксоспоридий было установлено, что из обитателей илистых грунтов 81.8 % видов являются хозяевами этих паразитов в Черном море, а из обитателей каменистых и песчаных грунтов миксоспоридиями поражено 47.4 % и 38.1 % рыб, соответственно. При этом наибольшее число

видов миксоспоридий, приходящихся на один вид хозяина, было у обитателей илистых (1.3) и песчаных (1.2) грунтов, а среди обитателей каменистого дна оно составляло 0.9 (Юрахно, 1994). На примере одного из черноморских представителей рода *Kudoa* — *K. nova* — нами была выявлена закономерность встречаемости наиболее высоких показателей инвазии этим паразитом бычков в самых мелководных районах Азовского и Черного морей, где существуют наиболее благоприятные условия для заражения миксоспоридиями новых хозяев (Юрахно, Горчанок, 2011; Юрахно, 2016). Но особый интерес для нас представляло выяснить, какова картина распределения миксоспоридий по глубинам в Мировом океане, с его огромным планетарным масштабом, мощными водными массами и, нередко, огромными глубинами. Литературные сведения по этому вопросу чрезвычайно скудны и касаются общих рассуждений.

Целью настоящей работы было показать, на каких глубинах могут быть встречены представители рода *Kudoa* рыб Мировой фауны и высказать предположение о том, в каких зонах происходит наиболее вероятное заражение представителями этого рода паразитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа основана на собственных и литературных данных по миксоспоридиям рыб Мирового океана и, в ряде случаев, прилегающих пресноводных водоемов. Проанализированы описания 128 видов миксоспоридий рода *Kudoia*, известных в мировой научной литературе до 2021 г. включительно. При составлении таблицы заражения рыб разных систематических групп миксоспориями рода *Kudoia* мы руководствовались системой рыб, предложенной Л.С. Бергом (1955), с учетом ценных поправок, внесенных позднее (Расс, Линдберг, 1971), обширной монографии Дж.С. Нельсона о рыбах мировой фауны (Nelson, 2006) и интернетных баз FishBase (<https://www.fishbase.se/search.php>) и WoRMS (Всемирный регистр морских видов) (<https://www.marinespecies.org/>). Три отряда рыб (Carangaria incertae sedis, Eupercaria incertae sedis и Arolentaria incertae sedis) приведены по международной базе данных (FishBase... 2023a, 2023b, 2023c). При изучении заражения рыб в зависимости от глубины их обитания мы также руководствовались FishBase, с уточнением данных в доступной нам литературе (Световидов, 1964; Фадеев, 2005; Дебелиус, 2009; The living marine resources ..., 2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования по данному вопросу практически не проводились. Известна лишь одна работа, в которой очаговое распространение рода *Kudoia* в Атлантической океане объясняется тем, что эти миксоспоридии, возможно, используют вертикальное поднятие морских вод для увеличения вероятности попадания спор в рыбу, в связи с чем океанические глубины, имеющие огромную протяженность, становятся для этих паразитов непреодолимым препятствием (Ковалева и др., 1979). На примере миксоспоридий другого рода — *Ceratomyxa* (вида *C. maxima*) прослежено влияние размеров споры на приуроченность к рыбам-хозяевам определенного горизонта водной толщи и сделан вывод о том, что чем крупнее размеры спор и полярных капсул, тем к более глубоким горизонтам они приурочены (Шульман и др., 1997). В данной монографии высказано предположение о том, что споры морских миксоспоридий чаще всего обладают одновременной адаптацией и к спусканию до определенного горизонта водной толщи, и к парению и зависанию на определенной глубине (то есть они обладают и грузилом, и поплавком одновременно), что позволяет им обеспечить приуроченность к существованию в самых разнообразных горизонтах от эпипелагиали до значительных глубин.

При подходе к изучению приуроченности разных видов *Kudoia* к различным глубинам мы не имели

фактических данных по находкам тех или иных видов этих миксоспоридий в хозяевах, выловленных на определенной глубине, за исключением нескольких случаев, поэтому использовали сведения ихтиологов об обобщенных данных по обитанию рыб на определенных глубинах (табл. 1). Сами ихтиологи считают, что сведения о глубине обитания рыб основаны на обобщенных, неполных и требующих проверки данных (Парин и др., 2014), но мы считаем, что они могут быть рассмотрены в целом для понимания приуроченности *Kudoia* к различным водным горизонтам и возможности вынесения этих паразитов с хозяевами на максимально известную глубину. То, что миксоспоридии разных родов (но не Кудоя) нередко встречаются в рыбах на предельной глубине их обитания, было установлено нами ранее в морских рейсах по Черному морю, где глубина тралов была достоверно известна (Yurakhno, 1997).

Таким образом, основываясь на известных данных (табл. 1), включая интернетный поиск по глубинам для видов, не имеющих эту информацию в литературе и Fishbase, мы разделили глубины обитания всех рыб-хозяев на три группы, согласно Н.В. Парину с соавторами (2014): 0 — 200 м, 200 — 1500 м и 1500 — 3000 м (абиссальные хозяева, обитающие глубже, для миксоспоридий рода Кудоя неизвестны), при этом осуществив и более подробную градацию глубин (табл. 2, рис. 1). Установить глубины обитания рыб-хозяев удалось для 290 из 295 известных видов (кроме 4 не идентифицированных до вида рыб и *Patagonotothen canina*). В случаях неизвестных данных о глубине обитания рыб для пресноводных видов *Aequidens plagiognathus*, *Chaetobranchopsis orbicularis* и *Kribia kribensis*, эстуарного вида, встречающегося в низовьях рек, *Acentrogobius chlorostigmatoides*, морских видов, обитающих в прибрежье, *Alosa mediocris*, *Konosirus punctatus*, *Fundulus heteroclitus*, бычков рода *Ponticola* (исключая *P. syrman*) и *Proterorhinus marmoratus*, кефалей *Minimugil cascasia*, *Mugil japonica*, *Osteomugil perusii*, *Planiliza carinata* и *Planiliza* sp. D sensu, *Plicofollis polystaphylodon*, а также рифового *Ariopsis felis* предположительной глубиной обитания была выбрана зона до 50 м.

Оказалось, что из 127 видов *Kudoia* (для одного вида из 128, известных на конец 2021 г. — *K. cutanea* от *Echiodon* sp. — определить глубину обитания хозяина не представляется возможным) исключительно в шельфовой зоне, тянущейся чаще всего до глубин в 200 м, могут обитать 90 видов этих паразитов, что составляет 70.8 % от числа всех видов. При этом 50 видов (39.4 % от общего числа) имеет хозяевами рыб, живущих ближе всего к береговой зоне либо обитающих на коралловых рифах на глубинах до 50 м. На этих же глубинах или выше 50 м, как в случаях с *K. hallado* и *K. peruvi-anus* от *Merluccius gayii*, *K. ramsayi* от *Patagonotothen*

Таблица 1. Встречаемость микроспоридий рода *Kudoa* в рыбах различных таксонов Мировой фауны с указанием глубины обитания хозяев*

Виды рыб с указанием их таксономической принадлежности	Глубина обитания рыб (метры) (в скобках – чаще всего)	Виды микроспоридий рода <i>Kudoa</i>
Класс Chondrichthyes – Хрящевые рыбы		
Подкласс Elasmobranchii – Пластиножаберные		
Надотряд Selachomorpha – Акулы		
Отряд Carcharhiniformes – Кархаринообразные		
Семейство Carcharhinidae – Кархариновые, или Серые акулы, или Пилозубые акулы		
<i>Carcharhinus cautus</i>	0–20	<i>K. carcharhini</i>
<i>C. amboinensis</i>	0–150	<i>K. carcharhini</i>
<i>C. limbatus</i>	0–140 (0–30)	<i>K. carcharhini</i>
Отряд Orectolobiformes – Воббегонгообразные		
Семейство Hemiscylliidae – Азиатские кошачьи акулы		
<i>Hemiscyllium ocellatum</i>	0–50	<i>K. hemiscylli</i>
Семейство Orectolobidae – Ковровые акулы		
<i>Orectolobus hutchinsi</i>	0–106 (0–79)	<i>K. hemiscylli</i>
<i>O. maculatus</i>	0–248 (0–110)	<i>K. hemiscylli</i>
<i>O. ornatus</i>	0–100	<i>K. hemiscylli</i>
Надотряд Batomorpha – Скаты		
Отряд Myliobatiformes – Хвостоколообразные		
Семейство Dasyatidae – Хвостоколовые		
<i>Hemityrion fluviorum</i>	1–140	<i>K. hemiscylli</i>
<i>Neotrygon kuhlii</i>	0–170 (?–90)	<i>K. hemiscylli</i>
<i>Taeniura lymma</i>	1–120	<i>K. hemiscylli</i>
Отряд Rhinopristiformes – Гитарникообразные		
Семейство Rhinobatidae – Гитарниковые		
<i>Aptychotrema rostrata</i>	?–220	<i>K. hemiscylli</i>
<i>Glaucostegus typus</i>	0–100	<i>K. hemiscylli</i>
Класс Actinopterygii – Лучеперые		
Инфракласс Teleostei – Костистые рыбы		
Отряд Carangaria incertae sedis		
Семейство Sphyraenidae – Барракудовые		
<i>Sphyraena jello</i>	20–200 (?–60)	<i>K. sphyraeni</i>
<i>S. pinguis</i>	3–6	<i>K. megacapsula</i>
<i>S. putnamae</i>	3–20	<i>K. barracudai</i>
Отряд Eupercaria incertae sedis		
Семейство Gerreidae – Мохарровые		
<i>Eugerres brasiliensis</i>	?–30	<i>K. eugerres</i>
Семейство Labridae – Губановые		
<i>Coris julis</i>	0–120 (1–60)	<i>K. quadratum</i>

Продолжение таблицы 1

Виды рыб с указанием их таксономической принадлежности	Глубина обитания рыб (метры) (в скобках — чаще всего)	Виды миксоспоридий рода <i>Kudoa</i>
<i>Halichoeres bivittatus</i>	1–15	<i>K. ovivora</i>
<i>H. garnoti</i>	2–80 (4–60)	<i>K. ovivora</i>
<i>H. poeyi</i>	1–15	<i>K. ovivora</i>
<i>Tautoglabrus adspersus</i>	10–128	<i>K. clupeidae</i>
<i>Thalassoma bifasciatum</i>	0–40 (3–30)	<i>K. ovivora</i>
<i>Th. lunare</i>	1–20	<i>K. thalassomi</i>
<i>Th. lutescens</i>	1–30	<i>K. thalassomi</i>
Семейство Lethrinidae — Летриновые		
<i>Gymnocranius audleyi</i>	8–40	<i>K. lethrini</i>
<i>Lethrinus harak</i>	0–20	<i>K. lethrini</i>
<i>L. nebulosus</i>	10–75	<i>K. iwatai</i>
<i>L. variegatus</i>	1–150	<i>K. iwatai</i>
Семейство Lutjanidae — Луциановые		
<i>Caesio cuning</i>	1–60	<i>K. chaetodoni</i>
<i>Lutjanus campechanus</i>	10–190 (30–130)	<i>K. hypoepicardialis</i>
<i>L. carponotatus</i>	1–80	<i>K. chaetodoni</i>
<i>L. ehrenbergii</i>	5–20	<i>K. lethrini</i> , <i>K. yasunagai</i>
<i>L. erythropterus</i>	5–100	<i>K. iwatai</i> , <i>K. lutjanus</i>
<i>L. fulviflamma</i>	3–35	<i>K. lethrini</i>
<i>L. lemniscatus</i>	2–80	<i>K. lemniscati</i>
Семейство Monodactylidae — Монодактиловые		
<i>Monodactylus argenteus</i>	0–12	<i>K. monodactyli</i>
Семейство Moronidae — Мороновые		
<i>Dicentrarchus labrax</i>	10–100	<i>K. dicentrarchi</i> , <i>K. iwatai</i>
<i>D. punctatus</i>	30–?	<i>K. dicentrarchi</i>
Семейство Nemipteridae — Нитеперые		
<i>Nemipterus japonicus</i>	5–80	<i>K. schulmani</i>
<i>Scolopsis monogramma</i>	2–50	<i>K. yasunagai</i>
Семейство Priacanthidae — Каталуфовые		
<i>Priacanthus hamrur</i>	8–250	<i>K. iwatai</i>
Семейство Scaridae — Скардовые, или Рыбы-попугаи		
<i>Calotomus japonicus</i>	?	<i>K. igami</i> , <i>K. lateolabracis</i> , <i>K. thalassomi</i> , <i>K. yasunagai</i>
<i>Scarus flavipectoralis</i>	2–40 (20–?)	<i>K. thalassomi</i>
<i>Sparisoma aurofrenatum</i>	2–20	<i>K. ovivora</i>
<i>S. radians</i>	1–13	<i>K. ovivora</i>
<i>S. rubripinne</i>	1–15	<i>K. ovivora</i>
Семейство Scianidae — Горбылевые		
<i>Cheilotrema fasciatum</i>	?	<i>K. sciaenae</i>
<i>Cynoscion nebulosus</i>	10–?	<i>K. inornata</i>
<i>Leiostomus xanthurus</i>	?–60	<i>K. branchiata</i> , <i>K. leiostomi</i>

Продолжение таблицы 1

Виды рыб с указанием их таксономической принадлежности	Глубина обитания рыб (метры) (в скобках — чаще всего)	Виды миксоспоридий рода <i>Kudoa</i>
<i>Nibea coibor</i>	?	<i>K. coibori</i>
<i>Paralonchurus peruanus</i>	10—?	<i>K. sciaenae</i>
<i>Pogonias cromis</i>	10—?	<i>K. hypoepicardialis</i>
<i>Sciaena deliciosa</i>	?	<i>K. sciaenae</i>
<i>Stellifer minor</i>	1—20	<i>K. sciaenae</i>
Семейство Sillaginidae — Силаговые		
<i>Sillago analis</i>	0—10	<i>K. ciliatae</i>
<i>S. ciliata</i>	0—46 (20—22)	<i>K. ciliatae</i> , <i>K. yasunagai</i>
<i>S. maculata</i>	0—50	<i>K. ciliatae</i> , <i>K. yasunagai</i>
<i>S. sihama</i>	0—60 (0—2)	<i>K. petala</i>
Семейство Sparidae — Спаровые, или Морские караси		
<i>Acanthopagrus latus</i>	?	<i>K. lutjanus</i>
<i>A. schlegelii</i>	15—?	<i>K. iwatai</i>
<i>Argyrops filamentosus</i>	50—200	<i>K. iwatai</i>
<i>Boops boops</i>	0—350 (0—100)	<i>K. boopsi</i>
<i>Dentex macrophtalmus</i>	30—500	<i>K. nova</i>
<i>Pagellus acarne</i>	?—500 40—100	<i>K. nova</i>
<i>Pagrus major</i>	10—200	<i>K. iwatai</i> , <i>K. yasunagai</i>
<i>P. pagrus</i>	0—200 (10—80)	<i>K. pagrusi</i>
<i>Rhabdosargus haffara</i>	10—?	<i>K. aegyptia</i>
<i>Sparus aurata</i>	1—150 (1—30)	<i>K. dicentrarchi</i> , <i>K. iwatai</i>
<i>Stenotomus chrysops</i>	15—?	<i>K. clupeidae</i>
Отряд Ovalentaria incertae sedis		
Семейство Pomacentridae — Помацентровые		
<i>Abudefduf bengalensis</i>	1—6	<i>K. amamiensis</i> , <i>K. thalassomi</i> , <i>K. whippsi</i>
<i>A. septemfasciatus</i>	0—3	<i>K. gunterae</i>
<i>A. sexfasciatus</i>	1—20	<i>K. amamiensis</i> , <i>K. gunterae</i>
<i>A. sordidus</i>	0—3	<i>K. gunterae</i>
<i>A. vagiensis</i>	1—15	<i>K. amamiensis</i> , <i>K. whippsi</i>
<i>A. whitleyi</i>	1—5	<i>K. amamiensis</i> , <i>K. thalassomi</i> , <i>K. whippsi</i>
<i>Acanthochromis polyacanthus</i>	1—65 (4—20)	<i>K. whippsi</i>
<i>Amblyglyphidodon curacao</i>	1—40 (1—15)	<i>K. thalassomi</i>
<i>Amphiprion akindynos</i>	1—25	<i>K. kenti</i> , <i>K. thalassomi</i> , <i>K. whippsi</i>
<i>A. melanopus</i>	1—18	<i>K. kenti</i> , <i>K. thalassomi</i> , <i>K. whippsi</i>

Продолжение таблицы 1

Виды рыб с указанием их таксономической принадлежности	Глубина обитания рыб (метры) (в скобках — чаще всего)	Виды микоспоридий рода <i>Kudoia</i>
<i>Chromis chrysurus</i>	6–45	<i>K. amamiensis</i>
<i>Ch. notata</i>	2–15	<i>K. amamiensis</i>
<i>Ch. viridis</i>	1–20	<i>K. gunterae</i> , <i>K. whippsi</i>
<i>Chrysiptera assimilis</i>	0–10	<i>K. amamiensis</i>
<i>C. cyanea</i>	0–10	<i>K. gunterae</i> , <i>K. thalassomi</i>
<i>Dascyllus aruanus</i>	0–20	<i>K. gunterae</i> , <i>K. thalassomi</i>
<i>D. trimaculatus</i>	1–55	<i>K. iwatai</i>
<i>Dischistodus perspicillatus</i>	1–10	<i>K. kenti</i>
<i>D. pseudochrysopoecilus</i>	1–5	<i>K. gunterae</i>
<i>Neoglyphidodon melas</i>	1–12	<i>K. gunterae</i> , <i>K. thalassomi</i> , <i>K. whippsi</i>
<i>Neopomacentrus miryae</i>	2–25	<i>K. iwatai</i>
<i>Plectroglyphidodon leucozonus</i>	0–6	<i>K. gunterae</i> , <i>K. kenti</i>
<i>Pomacentrus chrysurus</i>	0–5	<i>K. gunterae</i> , <i>K. whippsi</i>
Отряд Acanthuriformes — Хирургообразные		
Семейство Chaetodontidae — Щетинозубовые		
<i>Chaetodon baronessa</i>	5–20	<i>K. thalassomi</i>
<i>C. collaris</i>	1–20	<i>K. muscularis</i>
<i>C. paucifasciatus</i>	4–65	<i>K. iwatai</i>
<i>C. unimaculatus</i>	1–60	<i>K. chaetodonti</i> , <i>K. thalassomi</i>
<i>C. vagabundus</i>	5–30	<i>K. thalassomi</i>
<i>Chelmon rostratus</i>	1–25	<i>K. thalassomi</i>
<i>Heniochus monoceros</i>	2–30	<i>K. thalassomi</i>
Семейство Leiognathidae — Лиогнатиды, или Лиогнатовые, или Сребробрюшковые		
<i>Leiognathus brevirostris</i>	1–40	<i>K. uncinata</i>
<i>Nuchequula nuchalis</i>	?	<i>K. uncinata</i>
Семейство Lobotidae — Лоботовые, или Треххвостые окуни		
<i>Lobotes surinamensis</i>	0–70	<i>K. hypoepicardialis</i>
Семейство Siganidae — Сигановые		
<i>Siganus rivulatus</i>	1–30	<i>K. iwatai</i>
Отряд Acropomatiformes — Акропоматовые		
Семейство Lateolabracidae — Латеолабрациды, или Латеолабраховые, или Морские судаки, или Японские лавраки, или Азиатские морские окуни		
<i>Lateolabrax japonicus</i>	5–?	<i>K. cruciformum</i> , <i>K. iwatai</i> , <i>K. yasunagai</i>
<i>Lateolabrax sp.</i>	?	<i>K. lateolabracis</i>
Семейство Pempheridae — Пемферовые		
<i>Pempheris ypsilychnus</i>	1–24	<i>K. amamiensis</i> , <i>K. minithyrsites</i>
Отряд Atheriniformes — Атериноподобные		
Семейство Atherinidae — Атеринообразные		
<i>Atherina hepsetus</i>	0–?	<i>K. anatolica</i> , <i>K. stellula</i>
Отряд Batrachoidiformes — Батрахоподобные		
Семейство Batrachoididae — Батраховые		
<i>Batrachoides surinamensis</i>	1–36	<i>K. visuensis</i>

Продолжение таблицы 1

Виды рыб с указанием их таксономической принадлежности	Глубина обитания рыб (метры) (в скобках — чаще всего)	Виды миксоспоридий рода <i>Kudoa</i>
Отряд Beloniformes — Сарганообразные		
Семейство Belonidae — Саргановые		
<i>Strongylura strongylura</i>	5–25	<i>K. chilkaensis</i>
Семейство Eusoetidae — Летучие рыбы		
<i>Cypsilurus ago</i>	0–20	<i>K. thyrsites</i>
<i>Cypsilurus</i> sp.	?	<i>K. thyrsites</i>
Семейство Hemiramphidae — Полурыловые		
<i>Hyporhamphus gamberur</i>	0–?	<i>K. iwatai</i>
Отряд Beryciformes — Бериксообразные		
Семейство Berycidae — Бериковые		
<i>Beryx splendens</i>	25–1300 (400–600)	<i>K. thyrsites</i>
Отряд Blenniiformes — Собачкообразные		
Семейство Blenniidae — Собачковые		
<i>Parablennius gattorugine</i>	3–32	<i>K. quadratum</i>
<i>P. zvonimiri</i>	6–12	<i>K. quadratum</i>
Отряд Callionymiformes — Лирообразные		
Семейство Callionymidae — Лировые, или Морские мыши)		
<i>Callyonimus lyra</i>	5–430 (5–30)	<i>K. quadratum</i>
Отряд Carangiformes — Ставридообразные		
Семейство Carangidae — Ставридовые		
<i>Alepes djedaba</i>	?	<i>K. javaensis</i> , <i>K. pyramidalis</i>
<i>Atropus atropus</i>	?	<i>K. atropi</i>
<i>Carangoides fulvoguttatus</i>	?–100	<i>K. quadricornis</i>
<i>C. plagiotaenia</i>	2–200	<i>K. paraquadricornis</i>
<i>Caranx crysos</i>	0–100	<i>K. hypoeipicaldis</i>
<i>C. ignobilis</i>	10–188	<i>K. paraquadricornis</i>
<i>C. papuensis</i>	1–50	<i>K. paraquadricornis</i>
<i>C. sexfasciatus</i>	0–146	<i>K. amamiensis</i> , <i>K. paraquadricornis</i>
<i>Decapterus maruadsi</i>	0–? (0–20)	<i>K. decaptera</i>
<i>D. russeli</i>	40–275	<i>K. thyrsites</i>
<i>Seriola dumerili</i>	1–360 (18–72)	<i>K. amamiensis</i> , <i>K. insolita</i>
<i>S. lalandi</i>	3–825	<i>K. neurophila</i> , <i>K. thyrsites</i>
<i>S. quinquerradiata</i>	7–100	<i>K. amamiensis</i> , <i>K. iwatai</i> , <i>K. megacapsula</i> , <i>K. pericardialis</i> , <i>K. yasunagai</i>
<i>Trachurus capensis</i>	0–500 (100–300)	<i>K. nova</i>
<i>T. mediterraneus</i>	0–500 (5–250)	<i>K. quadratum</i>

Продолжение таблицы 1

Виды рыб с указанием их таксономической принадлежности	Глубина обитания рыб (метры) (в скобках — чаще всего)	Виды миксоспоридий рода <i>Kudo</i>
<i>T. picturatus</i>	305–370	<i>K. nova</i>
<i>T. trachurus</i>	0–1050 (100–200)	<i>K. azevedoi</i> , <i>K. nova</i> , <i>K. quadratum</i> , <i>K. thyrsites</i>
<i>T. trecae</i>	30–250	<i>K. nova</i>
<i>T. japonicus</i>	0–275 (50–275)	<i>K. trachuri</i>
Семейство Coryphaenidae — Корифеновые		
<i>Coryphaena hippurus</i>	0–85 (5–10)	<i>K. thyrsites</i>
Семейство Istiophoridae — Марлиновые, или Парусниковые		
<i>Istiophorus platypterus</i>	0–200 30–?	<i>K. musculoliquefaciens</i>
Семейство Xiphiidae — Мечерылые, или Меч-рыбы		
<i>Xiphias gladius</i>	0–2878 (0–550)	<i>K. musculoliquefaciens</i>
Отряд Centrarchiformes		
Семейство Latridae — Трубачевые		
<i>Latris lineata</i>	5–400	<i>K. neurophila</i>
Семейство Oplegnathidae — Ножезубы, или Оплегнаты		
<i>Oplegnatus fasciatus</i>	1–10	<i>K. iwatai</i> , <i>K. yasunagai</i>
<i>O. punctatus</i>	3–135	<i>K. iwatai</i>
Отряд Cichliformes — Цихлообразные		
Семейство Cichlidae — Цихловые, или Цихлиды		
<i>Aequidens plagiozonatus</i>	?	<i>K. aequidens</i>
<i>Chaetobranchopsis orbicularis</i>	?	<i>K. orbicularis</i>
Отряд Clupeiformes — Сельдеобразные		
Семейство Clupeidae — Сельдевые		
<i>Alosa aestivalis</i>	5–55	<i>K. clupeidae</i>
<i>A. mediocris</i>	?	<i>K. clupeidae</i>
<i>A. pseudoharengus</i>	5–145 (56–110)	<i>K. clupeidae</i>
<i>Brevoortia tyrannus</i>	0–50	<i>K. clupeidae</i>
<i>Clupea harengus</i>	0–364 (0–200)	<i>K. clupeidae</i>
<i>Konosirus punctatus</i>	?	<i>K. guangdongensis</i>
<i>Sardinella lemuru</i>	15–100	<i>K. thyrsites</i>
<i>Sardinops sagax</i>	0–200	<i>K. thyrsites</i>
Семейство Engraulidae — Анчоусовые		
<i>Engraulis australis</i>	31–70	<i>K. thyrsites</i>
<i>E. encrasicolus</i>	0–400	<i>K. histolytica</i>
<i>E. japonicus</i>	0–400	<i>K. thyrsites</i>
Семейство Spratelloididae		
<i>Spratelloides delicatulus</i>	0–50	<i>K. thyrsites</i>
<i>S. robustus</i>	0–50	<i>K. thyrsites</i>

Продолжение таблицы 1

Виды рыб с указанием их таксономической принадлежности	Глубина обитания рыб (метры) (в скобках — чаще всего)	Виды миксоспоридий рода <i>Kudoa</i>
Отряд Cyprinodontiformes — Карпозубообразные:		
Семейство Fundulidae — Фундуловые		
<i>Fundulus heteroclitus</i>	?	<i>K. funduli</i>
<i>F. majalis</i>	0–1	<i>K. funduli</i>
Отряд Gadiformes — Трескообразные		
Семейство Gadidae		
<i>Gadus chalcogrammus</i>	?–1280 (30–400)	<i>K. thyrssites</i>
<i>Macruronus magellanicus</i>	30–500	<i>K. alliaris</i>
<i>Micromesistius australis</i>	50–900 (200–400)	<i>K. alliaris</i>
<i>M. poutassou</i>	150–3000 (300–400)	<i>K. thyrssites</i>
<i>Pollachius pollachius</i>	40–200 (40–100)	<i>K. thyrssites</i>
Семейство Merlucciidae — Мерлузовые		
<i>Merluccius australis</i>	28–1000	<i>K. alliaris</i>
<i>M. capensis</i>	50–1000 (150–450)	<i>K. thyrssites</i>
<i>M. gayi</i>	50–500	<i>K. hallado</i> , <i>K. peruvianus</i>
<i>M. hubbsi</i>	100–200	<i>K. alliaris</i> , <i>K. rosenbuschi</i>
<i>M. productus</i>	0–1000 (?–229)	<i>K. paniformis</i> , <i>K. thyrssites</i>
Отряд Gobiiformes — Бычкообразные		
Семейство Butidae — Бутовые		
<i>Kribia kribensis</i>	?	<i>K. eleotrisi</i>
Семейство Gobiidae		
<i>Acanthogobius hasta</i>	?	<i>K. akihitoi</i> , <i>K. empressmichikoe</i>
<i>Acentrogobius chlorostigmatoides</i>	?	<i>K. acenrogobia</i>
<i>Gobius cobitis</i>	2–35	<i>K. nova</i>
<i>G. cruentatus</i>	10–40	<i>K. niluferi</i>
<i>G. niger</i>	1–96 (1–50)	<i>K. nova</i>
<i>G. ophiocephalus</i>	0–30?	<i>K. nova</i>
<i>Knipowitschia longicaudata</i>	0–?	<i>K. nova</i>
<i>Mesogobius batrachocephalus</i>	15–100	<i>K. nova</i>
<i>Neogobius melanostomus</i>	0–30	<i>K. niluferi</i> , <i>K. nova</i>
<i>N. fluviatilis</i>	0–?	<i>K. nova</i>
<i>Pomatoschistus microps</i>	0–12	<i>K. camarguensis</i> , <i>K. nova</i>
<i>P. minutus</i>	4–200	<i>K. camarguensis</i> , <i>K. nova</i>
<i>Ponticola cephalargoides</i>	0–?	<i>K. nova</i>
<i>P. eurycephalus</i>	0–?	<i>K. nova</i>
<i>P. platyrostris</i>	0–?	<i>K. nova</i>
<i>P. ratan</i>	0–?	<i>K. nova</i>
<i>P. syrman</i>	0–10	<i>K. nova</i>

Продолжение таблицы 1

Виды рыб с указанием их таксономической принадлежности	Глубина обитания рыб (метры) (в скобках — чаще всего)	Виды миксоспоридий рода <i>Kudo</i>
<i>Proterorhinus marmoratus</i>	0—?	<i>K. nova</i>
<i>Tridentiger trigonocephalus</i>	0—?	<i>K. nova</i>
Отряд Kurtiformes — Куртообразные		
Семейство Arogonidae — Апогоновые, или Кардиналовые		
<i>Cheilodipterus macrodon</i>	0—40 (?—30)	<i>K. thalassomi</i>
<i>Ch. quinquelineatus</i>	0—40	<i>K. cheilodipteri</i>
<i>Ostorhinchus aureus</i>	1—40	<i>K. cheilodipteri</i> , <i>K. whippsi</i>
<i>O. cookii</i>	1—10	<i>K. iwatai</i>
<i>O. cyanosoma</i>	1—50 (1—15)	<i>K. cookii</i>
<i>O. doederleini</i>	0—10	<i>K. cheilodipteri</i> , <i>K. whippsi</i>
<i>O. fleurieu</i>	1—97 (1—35)	<i>K. whippsi</i>
<i>O. properuptus</i>	1—30 (1—14)	<i>K. iwatai</i>
<i>Zoramia leptacantha</i>	1—12	<i>K. gunterae</i> , <i>K. whippsi</i>
<i>Z. viridiventer</i>	0—50 (2—17)	<i>K. leptacanthae</i>
Отряд Mugiliformes — Кефалеобразные		
Семейство Mugilidae — Кефалевые		
<i>Chelon auratus</i>	?	<i>K. leptacanthae</i>
<i>Ch. labrosus</i>	10—20	<i>K. dicentrarchi</i> , <i>K. trifolia</i> , <i>K. uncapsula</i>
<i>Ch. ramada</i>	10—20	<i>K. dicentrarchi</i>
<i>Ch. saliens</i>	10—?	<i>K. dicentrarchi</i> , <i>K. trifolia</i> , <i>K. uncapsula</i>
<i>Crenimugil crenilabis</i>	0—20	<i>K. dicentrarchi</i>
<i>C. seheli</i>	0—3	<i>K. crenimugilis</i>
<i>Ellochelon vaigiensis</i>	0—5	<i>K. dicentrarchi</i>
<i>Liza parsia</i>	10—?	<i>K. yasunagai</i>
<i>Minimugil cascasia</i>	?	<i>K. sagarica</i>
<i>Mugil cephalus</i>	0—120 (0—10)	<i>K. cascasia</i>
<i>M. japonica</i>	?	<i>K. bora</i> , <i>K. dicentrarchi</i> , <i>K. tetraspora</i> , <i>K. intestinalis</i> , <i>K. iwatai</i> , <i>K. quadratum</i> , <i>K. surabayaensis</i>
<i>Osteomugil cunnesius</i>	0—3	<i>K. bora</i>
<i>O. perusii</i>	?	<i>K. borimiri</i> , <i>K. dicentrarchi</i> , <i>K. igori</i> , <i>K. valamugili</i>
<i>Planiliza carinata</i>	?	<i>K. bora</i> , <i>K. borimiri</i> , <i>K. dicentrarchi</i> , <i>K. fujitai</i>
<i>P. melinoptera</i>	0—5	<i>K. bora</i>
<i>P. parsia</i>	10—?	<i>K. dicentrarchi</i>
<i>Planiliza sp. D sensu</i>	?	<i>K. haridasae</i>
		<i>K. borimiri</i> , <i>K. dicentrarchi</i>

Продолжение таблицы 1

Виды рыб с указанием их таксономической принадлежности	Глубина обитания рыб (метры) (в скобках – чаще всего)	Виды миксоспоридий рода <i>Kudoa</i>
Отряд Ophidiiformes – Ошибнообразные		
Семейство <i>Carapidae</i> – Караповые		
<i>Echiodon</i> sp.	?	<i>K. cutanea</i>
Отряд Perciformes – Окунеобразные		
Семейство <i>Aulorhynchidae</i> – Длиннорылые колюшки, Аулоринховые		
<i>Aulorhynchus flavidus</i>	0–30	<i>K. thyrsites</i>
Семейство <i>Cheilodactylidae</i> – Джакасовые		
<i>Cheilodactylus zonatus</i>	2–25	<i>K. whipsi</i>
Семейство <i>Cottidae</i> – Рогатковые, или Керчаковые		
<i>Icelinus filamentosus</i>	18–800	<i>K. thyrsites</i>
<i>Leptocottus armatus</i>	0–156	<i>K. thyrsites</i>
<i>Myoxocephalus brandtii</i>	0–140 (25–50)	<i>K. nova</i>
<i>M. scorpius</i>	0–451	<i>K. quadratum</i>
Семейство <i>Cyclopteridae</i> – Пинагоровые		
<i>Cyclopterus lumpus</i>	0–868 (50–150)	<i>K. islandica</i>
Семейство <i>Hexagrammidae</i> – Терпуговые		
<i>Hexagrammos octogrammus</i>	0–200	<i>K. azoni</i>
<i>Ophiodon elongatus</i>	0–475	<i>K. thyrsites</i>
<i>Pleurogrammus azonus</i>	0–240	<i>K. azoni</i> , <i>K. pleurogrammi</i>
<i>P. monopterygius</i>	0–720	<i>K. pleurogrammi</i>
Семейство <i>Nototeniidae</i> – Нототениевые		
<i>Patagonotothen canina</i>	?	<i>K. alliaria</i>
<i>P. ramsayi</i>	50–500	<i>K. alliaria</i> , <i>K. ramsayi</i>
Семейство <i>Pholidae</i> – Маслоковые		
<i>Pholis ornata</i>	0–50	<i>K. thyrsites</i>
Семейство <i>Platycephalidae</i> – Плоскоголовые		
<i>Platycephalus</i> sp.	?	<i>K. iwatai</i>
Семейство <i>Polynemidae</i> – Пальцеперовые		
<i>Pentanemus quinquarius</i>	10–70	<i>K. iidae</i>
Семейство <i>Sebastidae</i> – Себастиды, или Себастовые, или Морские окуни		
<i>Sebastes elongatus</i>	25–425 (91–366)	<i>K. miniauriculata</i>
<i>S. minor</i>	3–100	<i>K. sebastea</i>
<i>S. paucispinis</i>	0–476	<i>K. clupeiidae</i> , <i>K. miniauriculata</i>
Семейство <i>Serranidae</i> – Каменные окуни		
<i>Cephalopholis boenak</i>	1–64 (4–30)	<i>K. thalassomi</i>
<i>Hyporthodus nigratus</i>	55–525	<i>K. hypoepicardialis</i>
<i>Morone saxatilis</i>	30–?	<i>K. cerebrealis</i>
Семейство <i>Zoarcidae</i> – Бельдюговые		
<i>Zoarces americanus</i>	0–388	<i>K. clupeiidae</i>

Продолжение таблицы 1

Виды рыб с указанием их таксономической принадлежности	Глубина обитания рыб (метры) (в скобках — чаще всего)	Виды миксоспоридий рода <i>Kudo</i>
Отряд Pleuronectiformes — Камбалообразные		
Семейство Bothidae — Ромбовые, или Арноглоссовые		
<i>Arnoglossus imperialis</i>	20–350 (40–200)	<i>K. lunata</i>
<i>A. laterna</i>	10–200 (10–100)	<i>K. lunata</i>
<i>A. thori</i>	15–300	<i>K. lunata</i>
Семейство Cynoglossidae — Циноглоссовые, или Левосторонние морские языки		
<i>Cynoglossus senegalensis</i>	10–110	<i>K. cynoglossi</i>
Семейство Paralichthyidae — Паралихтиевые		
<i>Paralichthys adspersus</i>	1–35	<i>K. thyrsites</i>
<i>P. olivaceus</i>	10–200	<i>K. lateolabracis</i> , <i>K. paralichthys</i> , <i>K. septempunctata</i> , <i>K. shiomitsui</i> , <i>K. thyrsites</i> , <i>K. yasunagai</i>
Семейство Pleuronectidae — Камбаловые, или Правосторонние камбалы		
<i>Atheresthes stomias</i>	18–950	<i>K. aburakarei</i> , <i>K. thyrsites</i>
<i>Hippoglossus stenolepis</i>	0–1200	<i>K. thyrsites</i>
<i>Lepidopsetta bilineata</i>	0–700 (0–183)	<i>K. thyrsites</i>
<i>Microstomus pacificus</i>	10–370	<i>K. thyrsites</i>
<i>Parophrys vetulus</i>	0–550	<i>K. thyrsites</i>
<i>Platichthys flesus</i>	1–100	<i>K. clupeidae</i>
Семейство Scophthalmidae — Калкановые		
<i>Zeugopterus punctatus</i>	1–40	<i>K. kabatai</i>
Отряд Salmoniformes — Лососеобразные		
Семейство Salmonidae — Лососевые		
<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	0–250	<i>K. thyrsites</i>
<i>O. kisutch</i>	0–250	<i>K. thyrsites</i>
<i>O. mykiss</i>	0–200	<i>K. thyrsites</i>
<i>O. tshawytscha</i>	0–375	<i>K. thyrsites</i>
<i>Salmo salar</i>	0–210 (10–23)	<i>K. thyrsites</i>
Отряд Scombriformes — Скумбриеобразные		
Семейство Centrolophidae — Центролофовые		
<i>Hyperoglyphe japonica</i>	150–1537	<i>K. ogawai</i>
<i>Icichthys australis</i>	0–2141	<i>K. vesica</i>
Семейство Gempylidae — Гемпиловы, или Змеевидные макрели		
<i>Thyrsites atun</i>	0–550 (100–500)	<i>K. thyrsites</i>
Семейство Nomeidae — Номеевые		
<i>Nomeus gronovii</i>	200–1000	<i>K. hypoepicardialis</i>
Семейство Pomatomidae — Луфаревые		
<i>Pomatomus saltatrix</i>	0–200	<i>K. clupeidae</i> , <i>K. hypoepicardialis</i> , <i>K. nova</i>

Продолжение таблицы 1

Виды рыб с указанием их таксономической принадлежности	Глубина обитания рыб (метры) (в скобках — чаще всего)	Виды миксоспоридий рода <i>Kudoa</i>
Семейство Scombridae — Скумбриевые		
<i>Auxis thazard</i>	50—?	<i>K. histolytica</i>
<i>Euthunnus alletteratus</i>	1—150	<i>K. nova</i>
<i>Grammatorcynus bicarinatus</i>	15—50	<i>K. grammatorcyni</i>
<i>Rastrelliger kanagurta</i>	20—90	<i>K. quraishii</i> , <i>K. saudiensis</i>
<i>Sarda sarda</i>	80—200	<i>K. histolytica</i>
<i>Scomber japonicus</i>	0—300 (50—200)	<i>K. caudata</i> , <i>K. histolytica</i> , <i>K. scomberi</i> , <i>K. thyr sites</i>
<i>S. scombrus</i>	0—1000 (0—200)	<i>K. histolytica</i> , <i>K. thyr sites</i>
<i>Scomberomorus commersoni</i>	10—70	<i>K. crumena</i> , <i>K. permulticapsula</i> , <i>K. scomberemori</i>
<i>S. maculatus</i>	10—35	<i>K. crumena</i>
<i>S. niphonius</i>	0—200	<i>K. konishiae</i>
<i>S. sierra</i>	10—60	<i>K. rayformis</i>
<i>Thunnus alalunga</i>	0—600	<i>K. thunni</i>
<i>T. albacares</i>	1—250 (1—100)	<i>K. crumena</i> , <i>K. hexapunctata</i> , <i>K. neothunni</i>
<i>T. obesus</i>	0—1500 (0—500)	<i>K. nova</i>
<i>T. orientalis</i>	1—550	<i>K. hexapunctata</i> , <i>K. prunusi</i> , <i>K. yasunagai</i>
<i>T. thynnus</i>	0—985 (0—100)	<i>K. clupeidae</i> , <i>K. nova</i>
Семейство Trichiuridae — Волосохвостые, или Рыбы-сабли		
<i>Lepidopus caudatus</i>	42—620 (100—300)	<i>K. thyr sites</i>
<i>Trichiurus lepturus</i>	0—589 (100—350)	<i>K. mirabilis</i>
Отряд Scorpaeniformes — Скорпенообразные		
Семейство Anarhichadidae — Зубатковые		
<i>Anarhichas lupus</i>	1—600 (18—110)	<i>K. islandica</i>
<i>A. minor</i>	25—600 (100—400)	<i>K. islandica</i>
Отряд Siluriformes — Сомообразные		
Семейство Ariidae — Ариевые		
<i>Ariopsis felis</i>	?	<i>K. shkae</i>
<i>Plicofollis layardi</i>	20—50	<i>K. tachysurae</i>
<i>P. platystomus</i>	?	<i>K. bengalensis</i>
<i>P. polystaphylodon</i>	?	<i>K. quadratum</i>
Семейство Plotosidae — Угрехвостые сомы		
<i>Plotosus lineatus</i>	1—60	<i>K. yasunagai</i>
Отряд Syngnathiformes — Иголообразные		
Семейство Syngnathidae — Иголовые		
<i>Entelurus aequoreus</i>	5—100 (1—20)	<i>K. quadratum</i>

Окончание таблицы 1

Виды рыб с указанием их таксономической принадлежности	Глубина обитания рыб (метры) (в скобках — чаще всего)	Виды миксоспориций рода <i>Kudoia</i>
<i>Syngnathus abaster</i>	0–5	<i>K. quadratum</i>
<i>S. acus</i>	0–110	<i>K. quadratum</i>
<i>S. tenuirostris</i>	(3–12)	<i>K. quadratum</i>
<i>S. tenuirostris</i>	3–20	<i>K. quadratum</i>
Отряд Tetraodontiformes — Иглобрюхообразные		
Семейство Tetraodontidae — Четырехзубые, или Иглобрюхие, или Скалозубые, или Кантигастровые		
<i>Sphoeroides annulatus</i>	10–60	<i>K. diana</i>
<i>Takifugu rubripes</i>	?	<i>K. shiomitsui</i> , <i>K. yasunagai</i>
Отряд Zeiformes — Солнечникообразные		
Семейство Zeidae — Солнечниковые		
<i>Zeus capensis</i>	35–200	<i>K. thyrsites</i>
<i>Z. faber</i>	5–400	<i>K. thyrsites</i>
	(50–150)	

Примечание. * — все латинские названия таксонов выставлены в алфавитном порядке, сначала Хрящевые, потом Костистые рыбы. Среди последних первыми идут отряды incertae sedis.

Таблица 2. Возможная встречаемость на разных глубинах миксоспориций рода *Kudoia* рыб Мировой фауны

Виды <i>Kudoia</i>	Глубины, метры									
	0–200				200–1500			1500–3000		
	до 50	до 100	до 150	до 200	до 500	до 1000	до 1500	до 2000	до 2500	до 3000
<i>K. aburakarei</i>	+	+	+	+	+	+				
<i>K. acenrogobia</i>	+									
<i>K. aegyptia</i>	+									
<i>K. aequidens</i>	+									
<i>K. akihitoi</i>	+									
<i>K. allaria</i>	+	+	+	+	+	+				
<i>K. amamiensis</i>	+	+	+	+	+					
<i>K. anatolica</i>	+									
<i>K. atropi</i>	+	+								
<i>K. azevedoi</i>	+	+	+	+	+	+	+			
<i>K. azoni</i>	+	+	+	+	+					
<i>K. barracudai</i>	+									
<i>K. bengalensis</i>	+									
<i>K. boopsi</i>	+	+	+	+	+					
<i>K. bora</i>	+	+	+							
<i>K. borimiri</i>	+									
<i>K. branchiata</i>	+	+								
<i>K. camarguensis</i>	+	+	+	+						
<i>K. carcharhini</i>	+	+	+							
<i>K. cascasia</i>	+									
<i>K. caudata</i>	+	+	+	+	+					
<i>K. cerebralis</i>	+									
<i>K. chaetodoni</i>	+	+								

Продолжение таблицы 2

Виды <i>Kudoa</i>	Глубины, метры									
	0–200				200–1500			1500–3000		
	до 50	до 100	до 150	до 200	до 500	до 1000	до 1500	до 2000	до 2500	до 3000
<i>K. cheilodipteri</i>	+									
<i>K. chilkaensis</i>	+									
<i>K. ciliatae</i>	+									
<i>K. clupeidae</i>	+	+	+	+	+	+				
<i>K. coibori</i>	+									
<i>K. cookii</i>	+									
<i>K. crenimugilis</i>	+									
<i>K. cruciformum</i>	+									
<i>K. crumena</i>	+	+	+	+	+					
<i>K. cynoglossi</i>	+	+	+							
<i>K. decaptera</i>	+									
<i>K. diana</i>	+	+								
<i>K. dicentrarchi</i>	+	+	+							
<i>K. eleotrisi</i>	+									
<i>K. empressmichikoe</i>	+									
<i>K. eugerres</i>	+									
<i>K. fujitai</i>	+									
<i>K. funduli</i>	+									
<i>K. grammatorcyni</i>	+									
<i>K. guangdongensis</i>	+									
<i>K. gunterae</i>	+									
<i>K. hallado</i>		+	+	+	+					
<i>K. haridasae</i>	+									
<i>K. hemiscylli</i>	+	+	+	+	+					
<i>K. hexapunctata</i>	+	+	+	+	+	+				
<i>K. histolytica</i>	+	+	+	+	+	+				
<i>K. hypoeupicardialis</i>	+	+	+	+	+	+				
<i>K. igami</i>	+									
<i>K. igori</i>	+									
<i>K. iidae</i>	+	+								
<i>K. inornata</i>	+									
<i>K. insolita</i>	+	+	+	+	+					
<i>K. intestinalis</i>	+	+	+							
<i>K. islandica</i>	+	+	+	+	+	+				
<i>K. iwatai</i>	+	+	+	+	+					
<i>K. javaensis</i>	+									
<i>K. kabatai</i>	+									
<i>K. kenti</i>	+									
<i>K. konishiae</i>	+	+	+	+						
<i>K. lateolabracis</i>	+	+	+	+						
<i>K. leiostomi</i>	+	+								
<i>K. lemniscati</i>	+	+								
<i>K. leptacanthae</i>	+									
<i>K. lethrini</i>	+									
<i>K. lunata</i>	+	+	+	+	+					
<i>K. lutjanus</i>	+	+								

Продолжение таблицы 2

Виды <i>Kudoa</i>	Глубины, метры									
	0–200				200–1500			1500–3000		
	до 50	до 100	до 150	до 200	до 500	до 1000	до 1500	до 2000	до 2500	до 3000
<i>K. megacapsula</i>	+	+								
<i>K. miniauriculata</i>	+	+	+	+	+					
<i>K. minithyrsites</i>	+									
<i>K. mirabilis</i>	+	+	+	+	+	+				
<i>K. monodactyli</i>	+									
<i>K. muscularis</i>	+									
<i>K. musculoliquefaciens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. neothunni</i>	+	+	+	+	+					
<i>K. neurophila</i>	+	+	+	+	+	+				
<i>K. niluferi</i>	+									
<i>K. nova</i>	+	+	+	+	+	+	+			
<i>K. ogawai</i>				+	+	+	+	+		
<i>K. orbicularis</i>	+									
<i>K. ovivora</i>	+	+								
<i>K. pagrusi</i>	+	+	+	+						
<i>K. paniformis</i>	+	+	+	+	+	+				
<i>K. paralichthys</i>	+	+	+	+						
<i>K. paraquadricornis</i>	+	+	+	+						
<i>K. pericardialis</i>	+	+								
<i>K. permulticapsula</i>	+	+								
<i>K. peruvianus</i>		+	+	+	+					
<i>K. petala</i>	+	+								
<i>K. pleurogrammi</i>	+	+	+	+	+	+				
<i>K. prunusi</i>	+	+	+	+	+	+				
<i>K. pyramidalis</i>	+									
<i>K. quadratum</i>	+	+	+	+	+	+	+			
<i>K. quadricornis</i>	+	+								
<i>K. quraishii</i>	+	+								
<i>K. ramsayi</i>		+	+	+	+					
<i>K. rayformis</i>	+	+								
<i>K. rosenbuschi</i>			+	+						
<i>K. sagarica</i>	+									
<i>K. saudiensis</i>	+	+								
<i>K. schulmani</i>	+	+								
<i>K. sciaenae</i>	+									
<i>K. scomberi</i>	+	+	+	+	+					
<i>K. scomberemori</i>	+	+								
<i>K. seabatea</i>	+	+								
<i>K. septempunctata</i>	+	+	+	+						
<i>K. shiomitsui</i>	+	+	+	+						
<i>K. shkae</i>	+									
<i>K. sphyraeni</i>	+	+	+	+						
<i>K. stellula</i>	+									
<i>K. surabayaensis</i>	+	+	+							
<i>K. tachysurae</i>	+									

Виды <i>Kudoa</i>	Глубины, метры								
	0–200				200–1500			1500–3000	
	до 50	до 100	до 150	до 200	до 500	до 1000	до 1500	до 2000	до 3000
<i>K. tetraspora</i>	+	+	+						
<i>K. thalassomi</i>	+	+							
<i>K. thunni</i>	+	+	+	+	+	+			
<i>K. thyrsites</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. trachuri</i>	+	+	+	+	+				
<i>K. trifolia</i>	+								
<i>K. uncinata</i>	+								
<i>K. unicapsula</i>	+								
<i>K. valamugili</i>	+								
<i>K. vesica</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. visuensis</i>	+								
<i>K. whippsi</i>	+	+							
<i>K. yasunagai</i>	+	+	+	+	+	+			

ramsayi, и до 500 м встречаются рыбы-хозяева 16 видов (12.6 %) Кудоа, на глубинах до 1000 м – 14 видов (11 %) этих миксоспоридий, глубже обитают рыбы, в которых теоретически можно встретить единичные виды *Kudoa*: до 1500 м – 3 вида (2.4 %), до 2000 м (с оговоркой, что хозяин *K. ogawai*, *Hyperoglyphe japonica*, может встречаться на глубине от 150 до 2000 м) и до 2500 м по одному виду (0.8 % каждый), до 3000 м – 2 вида (1.6 %) паразитов данного рода. При этом количество видов рыб-хозяев, обитающих исключительно в шельфовой зоне, представляет собой абсолютное большинство (223 вида, что составляет 76.9 % от их общего числа), тогда как

видов, обитающих как на шельфе, так и до глубин 500 и 1000 м значительно меньше (36 видов (12.4 %) и 22 вида (7.6 %), соответственно), тогда как на глубинах до 1500 м обитает лишь 5 видов рыб (1.7 %), в зонах до 2000 и 2500 м встречается по 1 виду рыб (по 0.3 %), а до 3000 м – 2 вида (0.7 %) (рис. 1).

А.А. Ковалевой с соавторами (1979) при анализе миксоспоридий рода *Kudoa* рыб Атлантического океана, было высказано мнение о том, что почти все находки миксоспоридий данного рода в этом водоеме приурочены к мелководью (шельфам) или близко расположенным к ним участкам, а вынесение некоторых представителей данных миксоспоридий в открытый океан может производиться такими активными мигрантами, как тунцы, заражение которых может происходить в прибрежной зоне. Это же касается, с нашей точки зрения, и тунцов, являющихся хозяевами многих видов *Kudoa*, и рыб семейств Парусниковые и Мечерылые, зараженных *K. musculoliquefaciens*, из других регионов (Тихого и Индийского океанов), а также других активных мигрантов. Поскольку все виды хозяев *Kudoa* обитают на шельфе, в ряде случаев выходя на большие глубины, наиболее вероятным и нам кажется заражение рыб данными паразитами именно в этой зоне Мирового океана, причем преимущественно в наиболее мелководной ее части с глубинами до 50 м, где могут встречаться хозяева 122 видов (96 %) *Kudoa*.

В этой зоне максимальна вероятность заражения новых хозяев миксоспоридиями, в том числе и представителями данного рода, как за счет того, что в этих водах обитает большее число хозяев, причем на разных стадиях их жизненного цикла, зачастую при большой скученности, так и по причине того, что паразиты в воде споры этих

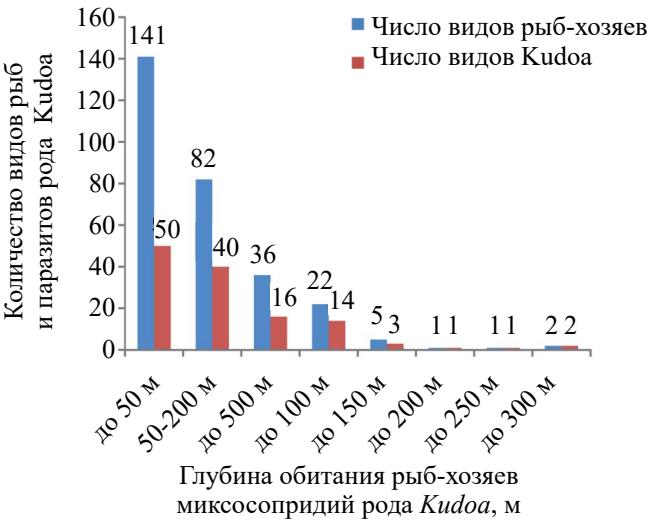


Рис. 1. Количество видов рыб-хозяев и миксоспоридий рода *Kudoa*, приуроченное к глубинам обитания хозяев.

паразитов имеют склонность опускаться на дно, и при взмучивании грунта в шторма они опять попадают в воду в прибрежной зоне, что невозможно в условиях открытого океана.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, глубинами, где происходит, вероятно, наиболее частое заражение рыб миксо-споридиями рода *Kudoia*, являются мелководные регионы шельфа, на котором могут быть встречены все виды миксо-споридий рода *Kudoia*, причем 90 видов (70.8 % от общего числа) встречаются исключительно в этой зоне, а хозяева 50 видов *Kudoia* (39.4 %) обитают на глубине до 50 м. На глубинах до 500 и до 1000 метров могут быть найдены 16 видов (12.6 %) и 14 видов (11 %) данного рода, соответственно. На глубинах до 1500 и 3000 м теоретически могут быть встречены от 1 до 3 видов Кудоя, что составляет от 0.8 до 2.4 % от всех известных представителей этих паразитов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор рукописи заявляет об отсутствии конфликта интересов

ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

Данная работа является теоретическим анализом, в ней отсутствуют практические исследования человека или животных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 124022400148-4 «Биоразнообразие как основа устойчивого функционирования морских экосистем, критерии и научные принципы его сохранения».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Берг Л.С. Система рыбообразных и рыб, ныне живущих и ископаемых // Тр. Зоол. ин-та АН СССР. 1955. Т. 20. С. 1–286.
- Дебелиус Х. Рыбы Атлантики, Средиземного и Черного морей. ИКАН, 2009. 308 с.
- Ковалева А.А., Шульман С.С., Яковлев В.Н. Миксо-споридии рода *Kudoia* (Muxosporidia, Multivalvulea) бассейна Атлантического океана. Систематика и экология споровиков и книдоспоридий. Л., 1979. С. 42–64. (Тр. ЗИН АН СССР; Т. 87).
- Парин Н.В., Евсеев С.А., Васильева Е.Д. Рыбы морей России: аннотированный каталог. М.: Товарищество научных изданий КМК. 2014. 733 с.
- Расс Т.С., Линдберг Г.У. Современные представления о естественной системе ныне живущих рыб // Вопросы ихтиологии. 1971. Т. 11, вып. 3 (68). С. 380–407.
- Световидов А.Н. Рыбы Черного моря. М., Л.: Наука, 1964. 550 с.
- Фадеев Н.С. Справочник по биологии и промыслу рыб северной части Тихого океана. Владивосток: ТИНРО-Центр, 2005. 366 с.
- Шульман С.С., Донец З.С., Ковалева А.А. Класс миксо-споридий мировой фауны. Т. 1. Общая часть. С.-Пб.: Наука, 1997. 578 с.
- Юрахно В.М. Миксо-споридии рыб Черного моря: систематика, фауна, экология, зоогеография // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.18 : 03.00.19. Севастополь, 1994. 22 с.
- Юрахно В.М. Миксо-споридии и микроспоридии рыб Каркинитского залива (Крым, Черное море) // Труды Центра паразитологии / Центр паразитологии Ин-та проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН. М.: Наука. 1948. Т. XLIX: Фауна и экология паразитов / (отв. ред.: С. О. Мовсесян). М.: Товарищество научных изданий КМК. 2016. С. 215–217.
- Юрахно В.М., Горчанок Н.В. Миксо-споридия *Kudoia nova* (Muxosporidia: Kudoidae) – паразит рыб Черного и Азовского морей // Морской экологический журнал. 2011. Т. X, № 2. С. 68–77.
- FishBase. *Carangaria incertae sedis* / Eds Froese R., Pauly D. 2023a. Accessed through: World Register of Marine Species at: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=1517511> on 2023-08-22
- FishBase. *Eupercaria incertae sedis* / Eds Froese R., Pauly D. 2023b. Accessed through: World Register of Marine Species at: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=1517577> on 2023-08-22
- FishBase. *Ovalentaria incertae sedis* / Eds Froese R., Pauly D. 2023c. Accessed through: World Register of Marine Species at: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=1517546> on 2023-08-22
- Nelson J.S. Fishes of the World. Fourth Edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley&Sons, Inc. 2006. 601 p
- The living marine resources of the Eastern Central Atlantic / Eds Carpenter K.E., De Angelis N.V. 3: Bony fishes part 1 (Elopiformes to Scorpaeniformes) FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes, Rome, FAO. 2016. P. 1511–2342.
- Yurakhno V.M. Influence of environmental factors on myxosporidian infestation of Black Sea fish in coastal waters // Oceanological Studies. 1997. no 1. P. 75–85.

Preferences of the Myxosporeans of genus *Kudoa* Meglitch, 1947 of the world's fauna fishes living at certain depths

V. M. Yurakhno

*A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS ,
Nakhimov avenue 2, Sevastopol, 299011 Russian Federation
e-mail: viola_taurica@mail.ru*

This paper provides the first information on the possible occurrence of myxosporeans of the genus *Kudoa* in fish of the World Ocean and, in several individual cases, in associated freshwater bodies at different depths. For the first time, an analysis of the theoretically assumed association of *Kudoa* to different depths of habitat of their fish hosts of the World fauna is given. It was revealed that in the shelf zones adjacent to the shores, all species of myxosporeans of the genus *Kudoa* can be found, of which 90 species (70.8% of the total) are found exclusively in the shelf zone, and the hosts of 50 species of *Kudoa* (39.4%) live in its shallowest part (up to 50 m). At depths from the shelf to 500 and 1000 meters, 16 species (12.6%) and 14 species (11%) of this genus can be found, respectively. At depths of up to 1500 and 3000 m, theoretically, from 1 to 3 species of *Kudoa* can be found, which is from 0.8 to 2.4% of all known representatives of these parasites.

Keywords: Myxosporea, *Kudoa*, Kudoidae, fish, depth, World fauna

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 595.384 (268.45)

ВЛИЯНИЕ БИОТИЧЕСКИХ И АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА СООБЩЕСТВА ЭПИБИОНТОВ КАМЧАТСКОГО КРАБА БАРЕНЦЕВА МОРЯ

© 2024 г. А. Г. Дворецкий*, @, В. Г. Дворецкий*

*Мурманский морской биологический институт РАН, ул. Владимирская, 17, Мурманск, 183038 Россия
@E-mail: ag-dvoretsky@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.01.2024 г.

После доработки 10.03.2024 г.

Принята к публикации 11.03.2024 г.

На основе многолетнего массива данных о видовом составе и индексах заселенности вида-вселенца камчатского краба Баренцева моря ассоциированными организмами проведен многомерный анализ для определения вклада биотических и абиотических факторов в структуру сообществ эпибионтов. Выявлено, что наибольшее значение для индексов разнообразия и интенсивности заселения имел размер хозяина и возраст экзоскелета. Роль абиотических факторов была существенно ниже, наиболее выраженные эффекты отмечены для температурных условий в периоды массовой линьки, когда, видимо, происходило первичное заселение панцирей крабов бентосными организмами. Полученные данные позволяют расширить представления о формировании эпибиоза десятиногих ракообразных и дает информацию для дальнейшего изучения процесса адаптации камчатского краба к условиям Баренцева моря.

Ключевые слова: камчатский краб, Баренцево море, эпибионты, многофакторный анализ

DOI: 10.31857/S1026347024050119, **EDN:** ulatiz

Вселение чужеродных видов в новые местообитания считается одной из важнейших угроз для биологического разнообразия экосистем-реципиентов, поскольку зачастую ведет к нарушению устоявшихся межвидовых взаимодействий и запускает каскад изменений, ведущих к деградации системы (Алимов, Богущкая, 2004). Помимо неконтролируемого распространения видов-инвайдеров, осуществляется и преднамеренная интродукция ценных видов для достижения экономических целей. Примером подобной интродукции является вселение камчатского краба в Баренцево море, итогом которой послужило формирование новой самовоспроизводящейся популяции, которая обеспечивает стабильные выловы (Кузьмин, Гудимова, 2002). Объем вылова камчатского краба в Баренцевом море постоянно повышается и приближается к величинам, которые фиксируются в нативном ареале камчатского краба (Охотское море) (Dvoretsky, Dvoretsky, 2022).

Важным вопросом до сих пор остается оценка экологических последствий от вселения камчатского краба. Поскольку этот вид занимает вершину пищевой цепи в бентосных сообществах, его пищевая активность, как предполагалось, может оказывать прямое воздействие на структуру

донных биоценозов. Ряд исследований подтвердил это мнение: в некоторых прибрежных районах отмечено снижение видового разнообразия и упрощение организации бентосных сообществ (Павлова, 2008, 2021; Pavlova, Dvoretsky, 2022). В то же время, анализ многолетних рядов данных показал, что динамика численности традиционных промысловых видов рыб и беспозвоночных не связана с вселением краба, то есть продуктивность экосистемы в целом не пострадала (Dvoretsky, Dvoretsky, 2015a, b).

Помимо пищевых взаимодействий, чужеродные организмы вступают в симбиотические отношения с аборигенными видами. Исследование этой проблемы позволяет оценить процесс адаптации вселенцев и местной фауны друг к другу. Также изучение эпибиоза десятиногих ракообразных часто дает новую информацию о биоразнообразии и его динамике в экосистемах (Williams, McDermott 2004; Dvoretsky, Dvoretsky 2021). Ранее были исследованы различные аспекты, связанные с симбиотическими отношениями камчатского краба в Баренцевом море, включая видовой состав организмов и индексы заселенности (Dvoretsky, Dvoretsky 2009a, b, 2011, 2013, 2024). Малоизученным остается вопрос о влиянии факторов,

в особенности, абиотических на процессы колонизации хозяев симбионтами.

Цель работы — оценка степени воздействия факторов среды на биоразнообразие эпибионтных сообществ камчатского краба и индексы заселенности массовых видов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования был использован массив данных по видовому составу и индексам заселенности камчатских крабов, отловленных в ходе береговых экспедиций ММБИ РАН на Восточном Мурмане за пятилетний период (2009–2013 гг.) (Дворецкий, Дворецкий, 2013а, б, 2016, 2018, 2019).

Для каждого краба рассчитывали стандартные индексы заселенности: экстенсивность заселения — доля крабов, заселенных данным симбиотическим видом (%) и интенсивность заселения — количество особей, приходящееся на каждого заселенного хозяина. Для колониальных видов животных и водорослей интенсивность не определяли. В качестве индексов биоразнообразия использовали видовое богатство (ВБ, количество видов) и индекс Шеннона (Magurran, 1988). Для оценки полноты изученности видового богатства были рассчитаны индексы Chao1 и Chao2 (Chao, 1984; 1987; Colwell, Coddington, 1994).

В качестве факторов, которые могут оказывать влияние на сообщества эпибионтов камчатского краба (независимые переменные) использовали следующие: размер краба (ДК, длина карапакса, мм), возраст экзоскелета (ВЭ, стадия линьки по шкале, взятой из работы (Кузьмин, Гудимова 2002)), пол краба (КМ — самцы, КФ — самки), глубина при отлове крабов (Гл, м), травмированность (УТ, число травмированных ног, утраченных или восстановленных), температура во время отлова краба ($T_0^{\circ}\text{C}$), температура воды прибрежной ветви Мурманского течения в слое 50–200 м в январе — июле соответствующего года (T_1 – $T_7^{\circ}\text{C}$) и среднегодовая ($T_{\text{г}}^{\circ}\text{C}$), взятые из работы (Карсаков и др., 2022).

Для определения того, какие факторы окружающей среды наиболее существенны для объяснения вариаций в составе сообществ, применяли анализ избыточности (RDA), где в качестве независимых переменных использовали две матрицы, одна включала интенсивность заселения для неколонильных видов (логарифмическая трансформация), другая — индексы биоразнообразия, рассчитанные для всей совокупности видов. Для расчета вклада факторов в общую вариацию и оценки их значимости применяли пермутационный тест Монте-Карло. Для статистических расчетов использовали программы NCSS PASS 2004, PAST 4.11 и CANOCO 4.5. Средние представлены со стандартной ошибкой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Всего за период исследований было проанализировано 388 камчатских крабов (62, 133, 77, 58 и 58 экз. в 2009–2013 гг. соответственно), размеры которых варьировали от 23.3 до 171.5 мм по длине карапакса. Отмечено снижение численности маломерных крабов. Так средний размер особи показал тенденцию к росту от 79.7 мм в 2009 г. до 119.4 в 2013 гг. Также возросла и доля крабов поздних стадий линьки. Самки преобладали в соотношении 2:1, что в целом отражает различия в миграционном поведении крабов разного пола (Кузьмин, Гудимова, 2002). Очевидно, что группировка крабов в изученном районе демонстрировала тенденцию к старению, что, в целом соответствовало общим трендам, отмеченным для популяции камчатского краба Баренцева моря при смене поколений (Бизиков и др., 2018).

Температура воды в прибрежной зоне Баренцева моря снижалась от января к марту, потом возрастала (рис. 1).

По среднегодовым значениям наименьшая температура отмечалась в 2011 г., а наибольшая — в 2012 г., отражая разное теплосодержание водных масс в прибрежье Баренцева моря (Карсаков и др., 2022).

В течение периода исследований индексы заселенности камчатских крабов основными группами симбионтов и комменсалов демонстрировали тенденцию к росту (табл. 1).

Наибольшая экстенсивность заселения отмечена для амфипод, а наибольшая интенсивность — для копепод. Ранее было показано, что амфиподы рода *Ischyrocus* концентрируются на ротовом аппарате краба (Dvoretzky, Dvoretzky 2009b) и размножаются на теле хозяина, формируя устойчивые ассоциации с хозяином (Dvoretzky, Dvoretzky, 2009a, 2011). Копеподы в значительных количествах заселяют жабры краба и зачастую служат пищей для более крупных симбионтов (Dvoretzky, Dvoretzky, 2013).

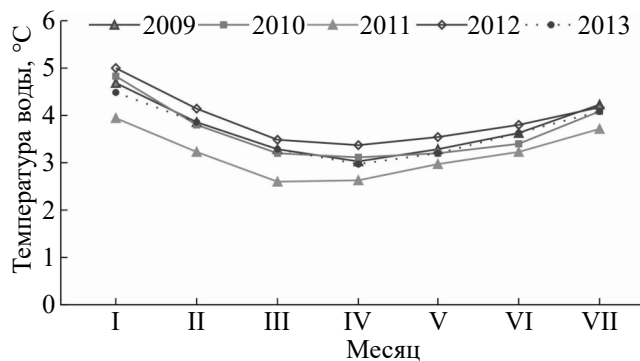


Рис. 1. Температура воды прибрежной ветви Мурманского течения в январе — июле 2009–2013 гг. (по Карсаков и др., 2022).

Таблица 1. Динамика индексов заселенности камчатского краба на Восточном Мурмане в летний период 2009–2013 гг.

Группа	Экстенсивность заселения, %					Средняя интенсивность заселения, экз./краб				
	2009	2010	2011	2012	2013	2009	2010	2011	2012	2013
Algae n = 4	—	—	—	—	13.8	—	—	—	—	—
Hydrozoa n = 8	8.1	11.3	7.8	12.1	25.9	—	—	—	—	—
Nemertea n = 2	9.7	4.5	6.5	8.6	10.3	8.5	4.5	1.8	4.2	2.2
Polychaeta (Sedentaria) n = 7	8.1	3.8	5.2	5.2	15.5	9.6	1.0	7.0	55.3	64.8
Polychaeta (Errantia) n = 5	6.5	9.0	7.8	19.0	29.3	1.3	1.1	1.2	1.9	3.4
Hirudinea n = 3	6.5	14.3	36.4	24.1	13.8	1.3	1.5	2.3	2.1	1.4
Gastropoda n = 4	3.2	2.3	7.8	6.9	15.5	1.0	1.0	1.0	1.3	2.0
Bivalvia n = 5	12.9	14.3	2.6	8.6	43.1	2.8	2.4	1.0	10.4	4.1
Copepoda n = 23	33.9	38.3	84.4	75.9	82.8	225.3	26.2	37.0	103.0	257.6
Amphipoda n = 7	58.1	72.9	87.0	84.5	81.0	51.7	44.2	70.3	70.4	87.7
Cirripedia n = 3	3.2	27.8	16.9	1.7	20.7	1.5	3.9	6.9	1.0	3.3
Echinodermata n = 3	—	1.5	1.3	1.7	1.7	—	1.0	1.0	1.0	1.0
Bryozoa n = 8	12.9	9.0	3.9	10.3	15.5	—	—	—	—	—
Прочие n = 8	—	—	7.8	3.4	8.6	—	—	1.0	1.0	1.0

Примечание. n – число видов в каждой группе.

Следует отметить и значительную среднюю интенсивность заселения крабов сидячими полихетами, многие виды которых были ранее отмечены и на других видах десятиногих ракообразных в качестве эпибионтов (Williams, McDermott, 2004).

Количество видов, приходящее на заселенного хозяина варьировало от 1 до 23 (среднее значение 4.8 ± 0.2), при этом индекс Chao1 варьировал от 1 до 51 (7.0 ± 0.6). Общее число видов за весь период исследований составило 90, а ожидаемое число (индекс Chao2) составило 106 ± 9 видов. Таким образом, наши данные адекватно отражают реальное видовое богатство сообщества эпибионтов камчатского краба.

За период исследований отмечено существенное повышение числа находок новых для камчатского краба эпибионтов, что нашло свое отражение

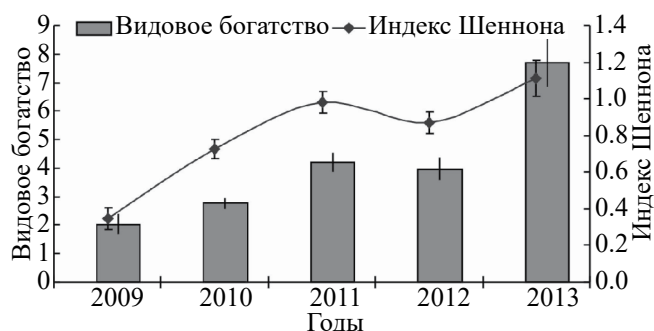


Рис. 2. Динамика индексов биологического разнообразия эпибионтных сообществ камчатского краба на Восточном Мурмане в летний период 2009–2013 гг. Представлены средние значения (из расчета на одного заселенного хозяина) со стандартными ошибками.

в увеличении индексов биоразнообразия эпибионтных сообществ (рис. 2).

В частности, в 2013 г. впервые были отмечены водоросли. Следует отметить, что водоросли обычно заселяют растительные виды крабов (Кузнецов, 1964; Firstater *et al.*, 2009). Их находки на крупных камчатских крабах, видимо, связаны с благоприятными для водорослей условиями оседания в периоды притока теплых атлантических вод.

В случае интенсивности заселения тест канонических осей показал наличие достоверной модели, которая объясняла 66.9% общей вариации ($F = 75.65$, $p = 0.001$). Первая ординационная ось показала наибольшую корреляцию с размером краба (отрицательная зависимость), а вторая ординационная ось была наиболее сильно связана с возрастом экзоскелета крабов и температурой воды в июне (рис. 3а). Две первых оси объясняли 63.1 и 2.5% вариации соответственно. Для индексов разнообразия, модель также была достоверной, объясняя 55.9% общей вариации ($F = 47.72$, $p = 0.001$). Первая ось обусловила 55.6% общей вариации и была положительно связана как с размером, так и возрастом краба (рис. 3б). Вторая ось показала наибольшие корреляции с этими же факторами.

Пермутационный тест Монте-Карло показал 5 факторов, которые достоверно объясняли вариации интенсивности заселения крабов. При этом размер краба имел наибольший вклад (59%), далее следовали возраст экзоскелета (3%) и температурные условия в январе (3%), июне (1%) и феврале (0.5%). Для индексов разнообразия выявлено 8 значимых факторов: размер краба (35%), возраст экзоскелета (13%), температура воды в марте (3%), пол краба, температура воды в январе, июле, среднегодовая температура и температура при отлове крабов (по 1%).

В отношении биотических факторов были получены ожидаемые результаты: размер краба напрямую влиял как на индексы заселенности, так и на разнообразие эпибионтных сообществ, а крабы поздних стадий линьки имели более богатые сообщества. Прямая зависимость между размерами и интенсивностью заселения отмечена для подавляющего числа симбиотических ассоциаций крабов (Williams, McDermott, 2004; Fernandez-Leborans, 2010). Частота линек тоже оказывает непосредственное воздействие на численность эпибионтов, позволяя накапливаться нескольким поколениям сожителей. Также этому способствуют активные миграции краба в разные биотопы, где повышается

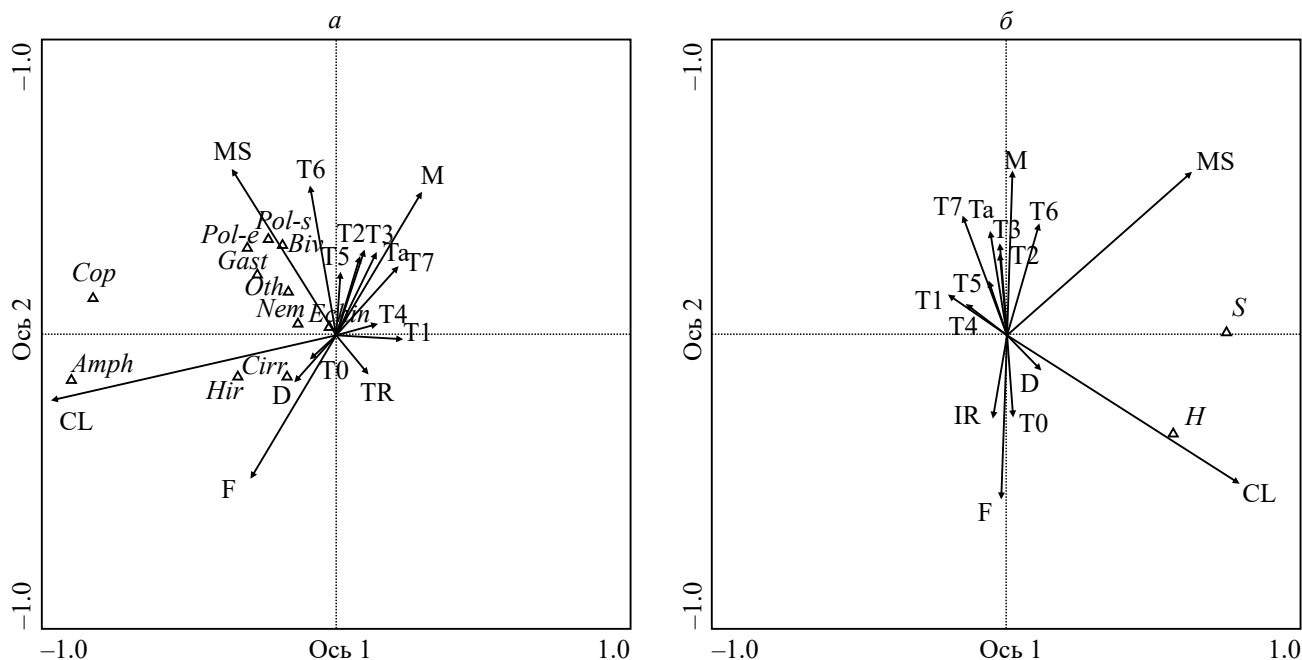


Рис. 3. Ординационные диаграммы, показывающие связь факторов среды со средней интенсивностью заселения крабов (а) и индексами биологического разнообразия эпибионтных сообществ (б). Независимые переменные: CL – длина карапакса, MS – стадия линьки, М – самцы, F – самки, D – глубина при отлове крабов, IR – число травмированных ног, T0 – температура во время отлова краба, T1–T7 – температура воды прибрежной ветви Мурманского течения в слое 50–200 м в январе – июле, Ta – среднегодовая температура воды. Зависимые переменные (интенсивность заселения): Nem – Nemertea, Pol-s – Polychaeta (Sedentaria), Pol-e – Polychaeta (Errantia), Hir – Hirudinea, Gast – Gastropoda, Biv – Bivalvia, Cop – Copepoda, Amph – Amphipoda, Cirr – Cirripedia, Echin – Echinodermata, Oth – Прочие. S – количество видов, H – индекс Шеннона.

шанс заселения местными видами (Тальберг, 2005). Нами впервые была отслежена роль температурного фактора в формировании эপিбиоза камчатского краба. Было показано, что наибольшее значение имели температурные условия в январе и марте. Этот результат хорошо соотносится со сроками массовой линьки особей камчатского краба: в январе этот процесс затрагивает крупных самцов, а в марте – самок (Кузьмин, Гудимова, 2002). Роль температуры может быть особенно важной для организмов, которые размножаются при помощи планктонных личинок, выживаемость которых напрямую зависит от теплосодержания водных масс, влияющего как на интенсивность течений (Matishov *et al.*, 2009), так и на распространение пелагических личинок (Bhaud *et al.*, 1995; Dvoretzky, Dvoretzky, 2022). Тесная связь температуры с интенсивностью заселения крабов видами с планктонной личинкой хорошо иллюстрируется близким взаимным расположением соответствующих векторов на ординационной диаграмме (рис. 3а).

Таким образом, сообщества симбионтов камчатского краба представляют собой динамическую систему, компоненты которой зависят не только от характеристик хозяина, но и от влияния температурных условий, что позволяет использовать данные сообщества в качестве индикаторов среды и средства для отслеживания дальнейшей адаптации и экспансии этого вселенца в Баренцевом море (Dvoretzky, Dvoretzky 2021).

Работа выполнена в рамках государственного задания ММБИ РАН за счет финансирования Минобрнауки.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные и российские институциональные принципы использования животных были соблюдены (акт ММБИ 188-1252/14, от 19 Декабря 2023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алимов А. Ф., Богуцкая Н. Г. Биологические инвазии в водных и наземных экосистемах М.: Товарищество научных изданий КМК, 2004. 436 с.
- Бизиков В. А., Сидоров Л. К., Алексеев Д. О., Буяновский А. И. Динамика численности и размерного состава камчатского краба в Баренцевом море в период 2003–2016 гг. // Тр. ВНИРО. 2018. Т. 172. С. 91–127.
- Дворецкий А. Г., Дворецкий В. Г. Сообщество обрастателей камчатского краба в губе Дальнезеленецкая (Восточный Мурман, Баренцево море): сравнительный анализ сезонных особенностей // Труды КарНЦ РАН. 2013а. № 2. Сер. Биогеография. Вып. 14. С. 78–85.
- Дворецкий А. Г., Дворецкий В. Г. Видовой состав макросимбионтов и обрастателей камчатского краба в прибрежье Баренцева моря (губа Дальнезеленецкая) в 2010 году // Вестник МГТУ. 2013б. Т. 16. № 3. С. 452–459.
- Дворецкий А. Г., Дворецкий В. Г. Исследование сообщества обрастателей камчатского краба в губе Дальнезеленецкая в 2011 году // Рыбное хозяйство. 2016. № 2. С. 57–59.
- Дворецкий А. Г., Дворецкий В. Г. Структура сообществ симбионтов камчатского краба в прибрежье Баренцева моря в 2012 г. // Труды ВНИРО. 2018. Т. 172. С. 160–171.
- Дворецкий А. Г., Дворецкий В. Г. Исследования эпибионтов камчатского краба в губе Дальнезеленецкая летом 2013 года // Рыбное хозяйство. 2019. № 1. С. 43–46.
- Карсаков А. Л., Трофимов А. Г., Анциферов М. Ю., Ившин В. А., Губанищев М. А. 120 лет океанографических наблюдений на разрезе «Кольский меридиан». Мурманск: ПИНРО, 2022. 146 с.
- Кузьмин С. А., Гудимова Е. Н. Вселение камчатского краба в Баренцево море. Особенности биологии, перспективы промысла. Апатиты: Изд-во КНЦ РАН, 2002. 236 с.
- Кузнецов В. В. Биология массовых и наиболее обычных видов ракообразных Баренцева и Белого морей. М.: Наука, 1964. 244 с.
- Павлова Л. В. Трофические связи камчатского краба и его воздействие на донные биоценозы // Биология и физиология камчатского краба прибрежья Баренцева моря / Отв. ред. Г. Г. Матишов. Апатиты: Изд. КНЦ РАН, 2008. С. 77–104.
- Павлова Л. В. Использование показателей выравненности видов для оценки влияния камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* (Tilesius, 1815) (Decapoda: Anomura) на бентос Баренцева моря // Биол. моря. 2021. Т. 47. С. 421–427. DOI: 10.31857/S0134347521060115
- Тальберг Н. Б. Сравнительная характеристика миграций камчатского краба на прибрежных акваториях Баренцева и Охотского морей // Тр. ВНИРО. 2005. Т. 144. С. 91–101.
- Bhaud M., Cha J. H., Duchene J. C., Nozais C. Influence of temperature on the marine fauna: what can be expected from a climatic change // J. Therm. Biol. 1995. V. 20. P. 91–104. DOI: 10.1016/0306-4565(94)00031-D
- Chao A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability // Biometrics 1987. V. 43. P. 783–791. DOI: 10.2307/2531532
- Chao A. Non-parametric estimation of the number of classes in a population // Scand. J. Stat. 1984. V. 11. P. 265–270. DOI: 10.2307/4615964

- Colwell R. K., Coddington J. A. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation // Phil. Trans. Royal Soc. Lond. 1994. V. 345. P. 101–118.
DOI: 10.1098/rstb.1994.0091
- Dvoretsky A. G., Dvoretsky V. G. Some aspects of the biology of the amphipods *Ischyrocerus anguipes* associated with the red king crab, *Paralithodes camtschaticus*, in the Barents Sea // Polar Biol. 2009a. V. 32. P. 463–469.
DOI: 10.1007/s00300-008-0541-x
- Dvoretsky A. G., Dvoretsky V. G. Distribution of amphipods *Ischyrocerus* on the red king crab, *Paralithodes camtschaticus*: Possible interactions with the host in the Barents Sea // Estuar. Coast. Shelf Sci. 2009b. V. 82. P. 390–396.
DOI: 10.1016/j.ecss.2009.01.025
- Dvoretsky A. G., Dvoretsky V. G. Population biology of *Ischyrocerus commensalis*, a crab-associated amphipod, in the southern Barents Sea: a multi-annual summer study // Mar. Ecol. 2011. V. 32. P. 498–508.
DOI: 10.1111/j.1439-0485.2011.00450.x
- Dvoretsky A. G., Dvoretsky V. G. Copepods associated with the red king crab *Paralithodes camtschaticus* (Tilesius, 1815) in the Barents Sea // Zool. Stud. 2013. V. 52. Article 17.
DOI: 10.1186/1810-522X-52-17
- Dvoretsky A. G., Dvoretsky V. G. Commercial fish and shellfish in the Barents Sea: Have introduced crab species affected the population trajectories of commercial fish? // Rev. Fish Biol. Fisheries. 2015a. V. 25. P. 297–322.
DOI: 10.1007/s11160-015-9382-1
- Dvoretsky A. G., Dvoretsky V. G. Size at maturity of female red king crab, *Paralithodes camtschaticus*, from the coastal zone of Kola Peninsula (southern Barents Sea) // Cah. Biol. Mar. 2015b. V. 56, 49–54.
DOI: 10.21411/CBM.A9EBE5D8C
- Dvoretsky V. G., Dvoretsky A. G. New echinoderm-crab epibiotic associations from the coastal Barents Sea // Animals. 2021. V. 11. Article 917.
DOI: 10.3390/ani11030917
- Dvoretsky V. G., Dvoretsky A. G. Ecology and distribution of red king crab larvae in the Barents Sea: a review // Water. 2022. V. 14. Article 2328.
DOI: 10.3390/w14152328
- Dvoretsky V. G., Dvoretsky A. G. Winter epibiotic community of the red king crab *Paralithodes camtschaticus* in Sayda Bay (Barents Sea) // Animals. 2024. V. 14, Article 100.
DOI: 10.3390/ani14010100
- Fernandez-Leborans G. Epibiosis in Crustacea: an overview // Crustaceana. 2010. V. 83. P. 549–640.
DOI: 10.1163/156854010X492707
- Firstater F. N., Hidalgo F. J., Lomovasky B. J., Gallegos P., Gamero P., Iribarne O. O. Effects of epibiotic *Enteromorpha* spp. on the mole crab *Emerita analoga* in the Peruvian central coast // J. Mar. Biol. Ass. UK. 2009. V. 89. P. 363–370.
DOI: 10.1017/S0025315408002208
- Magurran A. E. Ecological diversity and its measurement. Princeton Univ. Press: New Jersey, 1988. 185 p.
- Matishov G. G., Matishov D. G., Moiseev D. V. Inflow of Atlantic-origin waters to the Barents Sea along glacial troughs // Oceanologia. 2009. V. 51. P. 321–340.
DOI: 10.5697/oc.51-3.321
- Pavlova L. V., Dvoretsky A. G. Prey selectivity in juvenile red king crabs from the coastal Barents Sea // Diversity. 2022. V. 14. Article 568.
DOI: 10.3390/d14070568
- Williams J. D., McDermott J. J. Hermit crab biocoenoses; a worldwide review of the diversity and natural history of hermit crab associates // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2004. V. 305. P. 1–128.
DOI: 10.1016/j.jembe.2004.02.020

Impact of biotic and abiotic factors on epibiotic communities of the Barents Sea red king crab

A. G. Dvoretsky^{1, #}, V. G. Dvoretsky¹

Murmansk Marine Biological Institute of the Russian Academy of Sciences, Murmansk, 183038 Russia

[#]E-mail: ag-dvoretsky@yandex.ru

Based on a long-term dataset of species composition and infestation levels of associated organisms on the invasive Barents Sea red king crab, a multivariate analysis was conducted to determine the contributions of biotic and abiotic factors to the fouling community structure. Results indicate that host size and exoskeleton age were the most significant factors for diversity indices and infestation intensity. Abiotic factors played a diminished role in the formation of fouling communities. Temperature conditions during the mass molting periods were found to have significant effects, apparently serving as a catalyst for the primary settlement of crab shells by benthic organisms. Our data not only yield new insights into the formation of fouling communities of decapod crustaceans, but also provide valuable information for further studies on the adaptation process of the red crab to the conditions of the Barents Sea.

Keywords: red king crab, Barents Sea, epibionts, multifactor analysis