

ИЗВЕСТИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

# СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ



Журнал публикует статьи теоретических и экспериментальных исследований по различным аспектам биологии



НАУКА

— 1727 —

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Номер 6, 2024

---

---

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭВОЛЮЦИОННАЯ БИОЛОГИЯ

- Уникальность и филогенез микроба чумы *Yersinia pestis*  
В. В. Сунцов 683
- 

## БИОХИМИЯ

- Влияние разных режимов освещения и кормления на экспрессию генов *fadsd5*, *fadsd6*, *elovl2*, *elovl5a* десатураз и элонгаз в печени молоди атлантического лосося *Salmo salar* L. в условиях аквакультуры  
С. Н. Хуртина, С. А. Мурзина, М. В. Кузнецова, Н. Н. Немова 695
- Активность ферментов энергетического и углеводного обмена у сеголеток радужной форели (*Oncorhynchus mykiss* Walb.) при кормлении двумя видами коммерческих кормов  
М. А. Родин, М. В. Кузнецова, М. Ю. Крупнова, А. Е. Курицын, С. А. Мурзина, Н. Н. Немова 705
- 

## ГЕНЕТИКА

- Анализ мутаций типа G:C>T:A, G:C>A:T и G:C>C:G в гене TP53 у облученных женщин с раком молочной железы и без в отдаленные сроки после хронического радиационного воздействия  
В. С. Никифоров, А. В. Кореченкова, А. В. Аклев 716
- 

## БОТАНИКА

- Распространение *Letna* на границе ареала на северо-западе Мурманской области как результат антропогенных изменений водных объектов  
Н. В. Зуева, О. Г. Гришуткин, Д. Ю. Ефимов, А. А. Бобров 726
- Aristolochia* секции *Siphisia* in vitro  
О. В. Наконечная, И. В. Гафицкая, Е. П. Юсупова 735
- 

## ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

- Активность антиоксидантных ферментов и экспрессия кодирующих их генов в листьях растений пшеницы с разным аллельным статусом гена *GPC-VI* при оптимальном содержании цинка в среде и его дефиците  
Ю. В. Батова, Н. С. Репкина, А. А. Игнатенко, Н. М. Казнина 743
- 

## ЗООЛОГИЯ

- Влияние температуры воды на размерно-возрастной состав, численность популяции Черноморских моллюсков *Hydrobia acuta* и зараженность их партенитами трематод *Gynaecotyla adunca*  
Ю. В. Белоусова, М. В. Макаров, А. М. Лях 754
- Разработка и валидация метода оценки индивидуальных поведенческих характеристик собаки домашней (*Canis lupus familiaris*) путем онлайн-опроса владельцев  
Ю. В. Ганицкая, А. А. Эвер, В. В. Гриценко, Н. Ю. Феоктистова, А. В. Суров 761

---

## ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Взаимосвязь количественных показателей sCD56 и sCD16 с уровнем иммунокомпетентных клеток, цитокинов, циркулирующих иммунных комплексов и циклических нуклеотидов у практически здоровых людей, проживающих на Арктической территории

*А. В. Самодова, Л. К. Добродеева, В. П. Патракеева*

773

---

## ЭКОЛОГИЯ

Первичная продукция в литорали Онежского озера и ее роль в продуктивности водоема

*Е. В. Теканова*

786

Пригодность местообитаний и динамика ареала редких пустынных видов миксомицетов рода *Didymium* в условиях глобального изменения климата в Азии

*А. В. Власенко, В. А. Власенко*

796

Показатели метаболизма амфипод *Gammarus oceanicus*, подвергшихся воздействию октилфенола (4т-ОФ)

*Н. А. Березина, Ю. И. Губелит, Л. Г. Бакина, А. В. Егорова, С. В. Холодкевич*

809

Многолетняя динамика вирусов гриппа А птиц в популяциях кряквы (*Anas platyrhynchos*) Москвы и Московской области: зависимость от миграционной активности

*А. А. Трещалина, Е. Ф. Родина, А. С. Гамбарян, Е. Ю. Боровлева, К. В. Авилова, С. П. Харитонов, К. Е. Литвин*

817

# CONTENTS

---

---

No. 6, 2024

---

---

## THEORETICAL AND EVOLUTIONARY BIOLOGY

- Uniqueness and phylogenesis of the plague microbe *Yersinia pestis*  
*V. V. Suntsov* 683
- 

## BIOCHEMISTRY

- Influence of different lighting and feeding regimes on the expression of the *fadsd5*, *fadsd6*, *elovl2*, *elovl5a* desaturase and elongase genes in the liver of juvenile Atlantic Salmon *Salmo salar* L. under aquaculture conditions  
*S. N. Khurtina, S. A. Murzina, M. V. Kuznetsova, N. N. Nemova* 695
- Activity of energy and carbohydrate metabolism enzymes in Rainbow Trout fingerlings (*Oncorhynchus mykiss* Walb.) When feeding two types of commercial feed  
*M. A. Rodin, M. V. Kuznetsova, M. Yu. Krupnova, A. E. Kuritsyn, S. A. Murzina, N. N. Nemova* 705
- 

## GENETICS

- Analysis of G:C>T:A, G:C>A:T and G:C>C:G mutations in the TP53 gene in women with and without breast cancer in the long term period after chronic radiation exposure  
*V. S. Nikiforov, A. V. Korechenkova, A. V. Akleyev* 716
- 

## BOTANY

- Distribution of *Lemna* at the Range Boundary in the North-West of the Murmansk Region as a result of anthropogenic changes in water bodies  
*N. V. Zueva, O. G. Grishutkin, D. Yu. Efimov, A. A. Bobrov* 726
- Aristolochia* of *Siphisia* section in vitro  
*O. V. Nakonechnaya, I. V. Gafitskaya, E. P. Yusupova* 735
- 

## PLANT PHYSIOLOGY

- Activity of antioxidant enzymes and expression of the genes encoding them in leaves of wheat plants with different allelic status of the GPC-B1 gene with optimal zinc content in the environment and its deficiency  
*Yu. V. Batova, N. S. Repkina, A. A. Ignatenko, N. M. Kaznina* 743
- 

## ZOOLOGY

- Effect of water temperature on the size – age structure of the population of *Hydrobia acuta* Black Sea molluscs and on invasion with *Gynaecotyla adunca parthenitae*  
*Y. V. Belousova, M. V. Makarov, A. M. Lyakh* 754
- Development and validation of a method for assessing individual behavioral characteristics of a domestic dog (*Canis lupus familiaris*) by online survey of owners  
*Yu. V. Ganitskaya, A. A. Ever, V. V. Gritsenko, N. Yu. Feoktistova, A. V. Surov* 761

---

## PHYSIOLOGY OF ANIMALS AND HUMANS

The relationship of quantitative indicators SCD56 and SCD16 with the level of immunocompetent cells, cytokines, circulating immune complexes and cyclic nucleotides in practically healthy people living in the Arctic Territory

*A. V. Samodova, L. K. Dobrodeeva, V. P. Patrakeeva*

773

---

## ECOLOGY

Primary production in the littoral zone of Lake Onego and its contribution to the productivity of the reservoir

*E. V. Tekanova*

786

Habitat Suitability and Areal Dynamics of Rare Desert Species of Myxomycetes of the Genus *Didymium* Under Global Climate Change in Asia

*A. V. Vlasenko, V. A. Vlasenko*

796

Metabolic characteristics of the amphipod *Gammarus oceanicus* (Crustacea: Amphipoda) exposed to octylphenol (4-T-OP)

*N. A. Berezina, Yu. I. Gubelit, L. G. Bakina, A. V. Egorova, S. V. Kholodkevich*

809

Long-term dynamics of avian influenza viruses in populations of mallards (*Anas platyrhynchos*) in Moscow and the Moscow region: dependence on migration activity

*A. A. Treshchalina, E. F. Rodina, A. S. Gambaryan, E. Yu. Boravleva, K. V. Avilova, S. P. Kharitonov, K. E. Litvin*

817

УДК 576.851.45:616.98

## УНИКАЛЬНОСТЬ И ФИЛОГЕНЕЗ МИКРОБА ЧУМЫ *YERSINIA PESTIS*

© 2024 г. В. В. Сунцов

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Ленинский просп., 33, Москва, 119071 Россия  
E-mail: vvsuntsov@rambler.ru

Поступила в редакцию 05.01.2024 г.

После доработки 01.04.2024 г.

Принята к публикации 01.04.2024 г.

К 130-летию открытия Александром Йерсином  
возбудителя чумы – микроба *Yersinia pestis*

Филогении микроба чумы (*Yersinia pestis*), реконструированные на основе молекулярно-генетического (МГ) подхода, не конгруэнтны фактам, накопленным классическими научными направлениями: экологией, биогеографией, палеонтологией, эпизоотологией и другими. МГ подход, несмотря на свою продвинутость, не может назвать исходного хозяина возбудителя чумы и достоверно охарактеризовать корень филогенетического древа. Этот недостаток восполняет экологический в широком понимании (ЭКО) подход, оперирующий такими экологическими, филогеографическими и биогеографическими категориями, как подвид, географическая популяция, ареал, экологическая ниша, непосредственное родство. *Y. pestis*, будучи “обитателем крови” теплокровных грызунов-хозяев, передается трансмиссивным способом через укусы блох и является уникальным в семействе кишечных бактерий *Yersiniaceae* (*Enterobacteriaceae*). Согласно ЭКО подходу, его уникальность связана с происхождением в популяциях монгольского сурка-тарбагана (*Marmota sibirica*) от клона кишечного псевдотуберкулезного микроба *Y. pseudotuberculosis* O:1b при уникальных обстоятельствах – заражении популяции сурков псевдотуберкулезом не традиционным алиментарным путем на пастбище, а травматическим способом во время зимней спячки. Выявление исходного хозяина возбудителя чумы раскрывает широкие перспективы изучения его эволюционной истории (видообразования и внутривидовой диверсификации) и совершенствования методологии эколого-географических, филогеографических и филогенетических исследований этого особо опасного патогена.

**Ключевые слова:** *Yersinia pseudotuberculosis* O:1b, *Yersinia pestis*, перипатрическое видообразование, филогенез, филогеография, эволюционная модель, экологический сценарий

**DOI:** 10.31857/S1026347024060011, **EDN:** ulanje

В настоящее время филогенетические построения патогенных микроорганизмов немыслимы без использования современной молекулярно-генетической (МГ) методологии. В то же время в силу своей молодости МГ подход пока нельзя считать совершенным. Насколько велики достижения этого подхода в описании биологического разнообразия и в диагностике микроорганизмов, настолько подчас неопределенны и неубедительны его выводы по реконструкции филогений. МГ подход в последние полтора-два десятилетия занимает доминирующее положение в современной филогенетике микроорганизмов, но при этом очевидна переоценка его достижений и недооценка преемственности. Прошлое скрыто плотной завесой времени, и в реконструкции исторических событий (выдвижении и тестировании исторических гипотез), чтобы

заглянуть в далекое или даже в не столь отдаленное прошлое, полезны и необходимы все мыслимые приемы, подходы и методы, востребован всеобъемлющий научный опыт и многовековой фактологический багаж. Еще на заре филогенетики Э. Геккель предложил для реконструкции филогенезов животных использовать метод тройного параллелизма – анализировать данные трех биологических дисциплин: морфологии, палеонтологии и эмбриологии. Взаимное подтверждение филогенетических гипотез, созданных с использованием различных подходов и методов, значительно повышает уверенность в их достоверности. Подобный разносторонний методологический подход востребован и при реконструкции филогении возбудителя чумы. Доминирующий МГ подход в отдельности пока выглядит несовершенным и не самодостаточным.

Филогенез как таковой не наблюдаем, и филогенетические реконструкции имеют гипотетический характер. Филогении — это гипотетические истории высших таксонов ранга вида и выше, корни которых в подавляющем большинстве случаев давно вымерли или неизвестны, и предков изучаемых групп приходится “вычислять” и “расшифровывать” по признакам (маркерам) современных и ископаемых форм. Для этого разработаны сложные МГ методологии с использованием современных компьютерно-статистических технологий. Экологические сведения используются ограниченно. Несколько иначе дело обстоит с микробом чумы (*Yersinia pestis*). Его филогения является отражением по сути рецентного процесса видообразования и формирования современных внутривидовых форм (низших таксонов). Статистические расчеты МГ методами (“молекулярные часы”) показали, что историческая глубина этого процесса составляет не более 20–30 тыс. лет (Achtman *et al.*, 2004; Morelli *et al.*, 2010). Т.е. чумной микроб является эволюционно “юным” патогеном, сформировавшимся в (почти) современной биогеоэценотической обстановке, когда уже существовали современные виды и подвиды грызунов-хозяев и блох — переносчиков инфекции и аридные ландшафты в границах современных природных очагов. В таком случае при реконструкции истории чумного микроба экологические данные могут быть высокоинформативными, значительно повышающими вероятность правдоподобных заключений в предложенных гипотезах. Был открыт ныне процветающий прямой предок чумного микроба: им оказался возбудитель кишечной инфекции — дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки (ДСЛ), или, иначе, псевдотуберкулезный микроб 1-го серотипа *Yersinia pseudotuberculosis* 0:1b. В настоящее время достаточно подробно описано внутривидовое экологическое (гостальное), биохимическое, генетическое и молекулярное разнообразие микроба чумы, охарактеризованы различные внутривидовые формы (подвиды, геноварианты, биовары, экотипы, плазмидовары и т.д.), обнаружены и изучены фрагменты “археологической” ДНК чумного микроба из останков человеческих жертв исторических эпидемий и пандемий. Казалось бы, имеются все необходимые и достаточные данные для построения достоверной филогении этого микробного патогена. Тем не менее, несмотря на большие достижения в изучении микроба чумы, закономерности его видообразования и последующей внутривидовой эволюции пока остаются не вполне понятными. Созданные молекулярные гипотезы о филогении подчас противоречат экологическим и биогеографическим данным и не находят подтверждений в известных исторических событиях. В то же время за последние 130 лет со времени открытия чумного микроба наука накопила огромный

багаж общебиологических и общемедицинских знаний, которые не просто полезны, но в свете новых данных, полученных МГ подходом, просто необходимы для полноценной реконструкции истории этого эволюционно молодого патогена и для совершенствования МГ методологии филогенетических построений. Недостатки МГ подхода может восполнить экологический (ЭКО) в широком понимании (эколого-географический, биогеографический, филогеографический) подход. ЭКО подход, в дополнение к МГ подходу, оперирует такими экологическими, биогеографическими и генетическими категориями, как географическая популяция, подвид, ареал, экологическая ниша, непосредственное родство, поток генов, генетическая (де)стабилизация, причем не только в отношении самого возбудителя, но и в отношении его хозяев — грызунов и переносчиков — блох. Экологические, биогеографические и другие общебиологические данные и выводы в исторических реконструкциях играют не меньшую роль, чем вклад МГ подхода.

В предлагаемой работе констатируется перспективность современного МГ подхода в реконструкции эволюционной истории микроба чумы и в то же время указано на ограниченные возможности исключительно молекулярной методологии в решении этой проблемы. Утверждается, что в связи с уникальным систематическим положением чумного микроба в семействе кишечных обитателей *Yersiniaceae* (*Enterobacteriaceae*), эволюционной молодостью и сосуществованием с непосредственным псевдотуберкулезным предком перспектива выяснения его реальной филогении (филогеографического паттерна) состоит в интеграции ЭКО и МГ подходов. ЭКО подход, как и МГ подход, пока также нельзя считать вполне совершенным. Имеющихся в настоящее время данных о распространении и функционировании возбудителя ДСЛ в популяциях основных хозяев чумного микроба, где мог бы осуществляться процесс видообразования микроба *Yersinia pestis*, недостаточно для надежного суждения об этом эволюционном процессе, о популяционно-генетических и молекулярных механизмах формирования чумного микроба. Тем не менее интеграция этих подходов на современном этапе позволяет направить исследование в перспективном направлении.

## ДВА ОТКРЫТИЯ МГ ПОДХОДА

Возбудитель чумы был открыт А. Йерсином в 1894 г. в начале 3-й пандемии в Гонконге. Это открытие стало стартом всестороннего изучения вызываемой им апокалипсической болезни. В 1898 г. академиком Д.К. Заболотным было высказано предположение о естественной циркуляции микроба в популяциях диких грызунов в природе. Тем самым

еще в конце XIX века стал закладываться фундамент теории природной очаговости чумы (ТПОЧ), или *sylvatic plague*. Ко второй половине прошлого века был накоплен огромный багаж разносторонних сведений о чуме и ее возбудителе, были сформулированы основные положения ТПОЧ. Но методы реконструкции истории чумного микроба и филогенетических построений в догеномное время с точки зрения современной филогенетики оставались достаточно примитивными, “ручными”, свойственными ранней эмпирико-интуитивной геккелевской филогенетике. Алгоритмы филогенетических построений в ТПОЧ не были разработаны. Собственно, создавались не филогении, а вербальные гипотезы о времени, месте и условиях возникновения и мирового распространения возбудителя на основе отдельных экологических, биогеографических, биохимических, микробиологических, палеонтологических, геологических и других фактов. Факты анализировались и складывались в филогенетические “пазлы”, соответствующие уровню знаний того времени. Отсутствовали три основных требования для построения филогений: не были установлены анализируемые признаки, не были описаны модели эволюции этих признаков и не были разработаны методы анализа признаков. Но дело продвинулось далеко вперед на рубеже XX–XXI веков с бурным развитием геномики и внедрением МГ методологий в бактериологию.

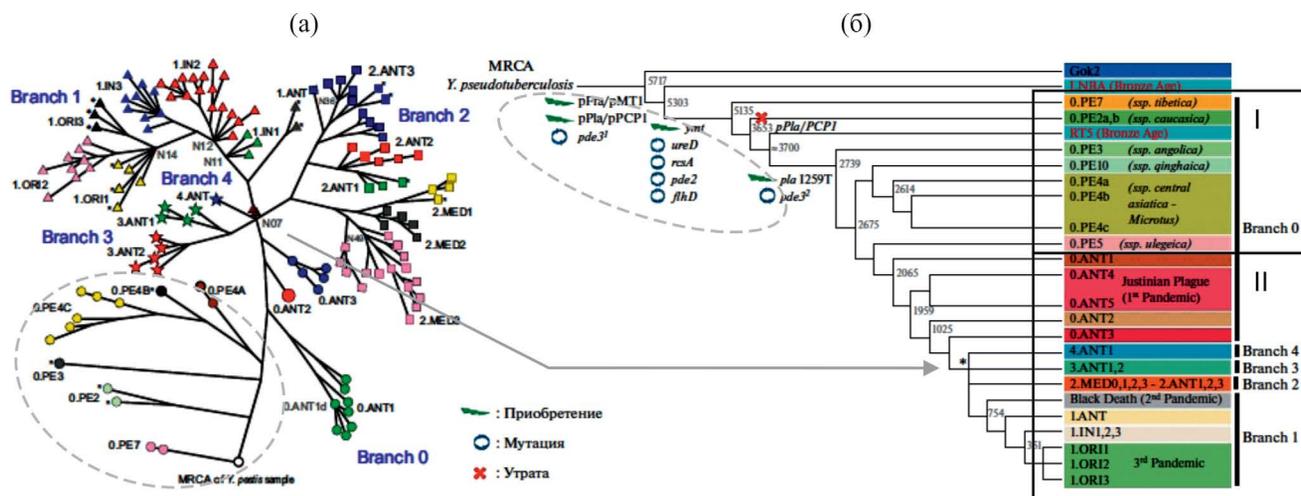
Внедрение МГ методов в бактериологию на рубеже XX и XXI веков привело к двум краеугольным открытиям в проблеме чумы. Во-первых, генетическими методами, изучением O-антигена, был установлен бесспорный прямой предок чумного микроба – возбудитель ДСЛ (*Skurnik et al.*, 2000). Этот кишечный психрофильный сапрозоонозный патоген широко распространен в неживой органике и в популяциях широкого круга беспозвоночных и позвоночных животных в холодных районах Сибири, Дальнего Востока и Центральной Азии (Сомов, 1979; *Fukushima et al.*, 2001). Отсюда последовало заключение, что видообразование чумного микроба из клона возбудителя ДСЛ прошло в каком-то холодном районе Азии, где имеются природные очаги чумы, наиболее вероятно – в Монголии с ее ультраконтинентальным климатом и/или в ее ближайшем окружении (Сунцов, 2022 а). Во-вторых, вопреки представлениям ТПОЧ о глубокой древности чумы, МГ методами была показана эволюционная молодость ее возбудителя, время возникновения которого, по молекулярным оценкам, отнесено (почти) к современности, не ранее 30 тыс. лет назад (*Achtman et al.*, 1999, 2004; *Morelli et al.*, 2010). Отсюда стало понятным, что видообразовательный процесс протекал в (почти) современной биогеоэкологической обстановке в популяции какого-то норového грызуна, обитающего в регионе, охватывающем

Южную Сибирь, Центральную Азию и Тибет, т.е. в регионе, где имеются “холодные” природные очаги чумы. При этом причиной появления возбудителя чумы, согласно здравому эволюционному смыслу, было какое-то изменение среды обитания возбудителя ДСЛ на рубеже плейстоцена и голоцена или в голоцене. Возник вопрос: где, когда, каким образом и при каких обстоятельствах произошел “видообразующий прорыв” кишечного микробно-обитателя в кровь теплокровных животных?

Два МГ открытия и большой объем ранее накопленной медико-биологической информации о чуме и ее возбудителе позволили логически связать многочисленные факты различных научных направлений: экологии, биогеографии, эпизоотологии, палеонтологии, микробиологии, (палео) климатологии и других – и создать экологический (в широком понимании) сценарий возникновения и азиатской экспансии нового микробного высокопатогенного вида *Y. pestis*, радикально отличающийся от МГ сценариев. Здесь важно отметить, что в пределах указанного “молекулярными часами” времени появления чумы, т.е. не ранее 30 тыс. лет назад, наиболее объемлющим климатическим изменением, которое привело к заметным пертурбациям в биоценозах холодных районов Азии и вызвало обильное формообразование и изменение ареалов животных и растений, было последнее максимальное сартанское похолодание 22–15 тыс. лет назад. Следствием этого похолодания стало глубокое промерзание почво-грунтов, в том числе и в центрально-азиатском регионе. Южная граница зоны “вечной мерзлоты” сдвинулась почти на тысячу км к экватору до 42° с.ш. и достигла пустыни Гоби в южной Монголии (*Owen et al.*, 1998), полностью охватив ареал монгольского сурка (*Marmota sibirica*). Этот факт, согласно ЭКО сценарию, стал ключевым в истории возникновения чумы.

#### МГ ФИЛОГЕНИИ *Y. PESTIS*

Современные гипотезы о филогении возбудителя чумы выстраивают на основе молекулярного подхода (рис. 1а, б) (*Cui et al.*, 2013; *Kutyrev et al.*, 2018; *Demeure et al.*, 2019). Наиболее популярными анализируемыми признаками в последние годы стали маркеры однонуклеотидного полиморфизма (SNPs, single nucleotide polymorphism). В качестве базовой эволюционной модели используют популярную модель равномерной нейтральной эволюции, в которой постулируется прямая статистическая связь между степенью полиморфизма и филогенетическим расстоянием между анализируемыми организмами, представляющими таксоны. Наиболее популярными методами анализа признаков стали статистические методы максимального правдоподобия и Байеса, в которых



**Рис. 1.** Типичные молекулярные филогении *Yersinia pestis*, созданные на основе SNP-анализа: (а) – по: Cui et al., 2013; (б) – по: Demeure et al., 2019. MRCA (most recent common ancestor) – абстрактная исходная форма возбудителя чумы. На дендрограмме (а) овалом очерчен кластер парафилетических (полифилетических?) геновариантов/подвидов, циркулирующих в популяциях сибирского тушканчика, полевков и монгольской пищухи в Азии. N07 – узел политомии (“Big Bang”). На кладограмме (б) демонстрируются генетические изменения во время видообразовательного процесса *Y. pestis* (очерчены овалом), но они не находят отражения в топологии филогенетического дерева. I и II – этапы мировой экспансии *Y. pestis*.

биологическая сущность признаков (модальность, полярность, вес и т.д.) не обсуждается.

Важным выводом МГ подхода в изучении филогении чумного микроба следует считать установление парафилетической (полифилетической?) структуры кластера “полевковых” геновариантов 0.РЕ (рис. 1 а), циркулирующих в популяциях полевков, сибирского тушканчика и монгольской пищухи в Азии (Cui et al., 2013; Кисличкина и др., 2019). Т.е. было показано, что “полевковые” геноварианты/подвиды не имеют прямого родства, формировались от абстрактно наиболее современного общего предка MRCA (most recent common ancestor) чумного микроба в разное время в различных географических регионах. К сожалению, МГ подход не раскрывает механизмы формирования кластера 0.РЕ. Вполне достоверное объяснение этому феномену дает ЭКО подход, изложенный ниже.

Другим существенным результатом МГ подхода стало выявление политомии на филогенетическом древе (N07, “Big Bang”), давшей “взрывное” начало филогенетическим ветвям 1–4 и субветви 0.(ANT) накануне, как полагают, второй пандемии (“Черная смерть”, 1346 г.) (рис. 1а, б) (Wu et al., 2022). Тем самым предполагается, что в истории микроба чумы имело место не столь отдаленное событие (почти) одновременного формирования и быстрого распространения на обширных пространствах Средней и Центральной Азии, Ближнего Востока, Тибета и Гималаев многих высоковирулентных геновариантов/подвидов. Причину “взрывного”

формообразования и “молниеносной” азиатской экспансии возбудителя в недавнем историческом прошлом (по МГ оценкам, приблизительно во времена крещения Руси и правления Чингиз-хана) МГ подход не раскрывает и даже не предполагает. Это событие в ЭКО подходе находит иное толкование и вполне достоверное экологическое объяснение, по меньшей мере, достойное обсуждения и изучения.

Еще одним важным выводом МГ подхода следует считать констатацию совместной циркуляции двух “полевковых” подвидов 0.РЕ4а (алтайский) и 0.РЕ5 (улегейский) в единой географической популяции монгольской пищухи *Ochotona pallasii pricei* на стыке Горного и Монгольского Алтая. Семисимпатрия этих подвидов неоспоримо свидетельствует о наличии параллелизмов (гомоплазий) в истории *Y. pestis* (Сунцов, 2023).

В то же время предложенные МГ филогении возбудителя чумы имеют существенные противоречия с “немолекулярными” фактами, которые ставят под сомнение некоторые “молекулярные” выводы. Отметим несколько несоответствий и противоречий.

Во-первых, МГ подход прокламирует двухэтапную азиатскую экспансию возбудителя из пока не вполне ясного центра видообразования (Тибет? Кавказ?) (Сунцов, 2021 б). Полагают, что сначала сформировался ареал исключительно “полевковых”, якобы наиболее древних очагов в Азии, охвативших обширные пространства от северо-востока Китая (0.РЕ4m = *Y. pestis microtus* = *Y. pestis xilingolensis*)

и восточного Тибета (0.PE7 = *Y. pestis tibetica*; 0.PE10 = *Y. pestis qinghaiensis*) на востоке до Кавказа (0.PE2 = *Y. pestis caucasica*) на западе (рис. 1б). Статус ангольского подвида 0.PE3 (*Y. pestis angolica*), который также считают одним из наиболее древних, остается не вполне понятным. “Чумоподобный” возбудитель (биовар Pestoides=0.PE) в этих очагах проявляет избирательную вирулентность и по некоторым МГ и биохимическим свойствам близок к своему псевдотуберкулезному предку. Позднее, согласно МГ гипотезе, по прошествии тысячелетий накануне первой пандемии (“Чума Юстиниана”, 541 г. н.э.), или некий абстрактный общий предок MRCA, или возбудитель определенного “полевкового” подвида проник в популяции алтайского сурка (*M. baibacina centralis*) на Тянь-Шане, где приобрел свойства “сурочьего” высоко-вирулентного биовара Antiqua (геноварианты/подвиды 0.ANT1, 0.ANT2, 0.ANT3, 0.ANT5) (рис. 1б). Далее, согласно МГ-выводам, возбудитель уже “реальной” чумы с Тянь-Шаня распространился в Азии второй волной в пределах прежнего “полевкового” ареала, дополнительно охватив северный Прикаспий, Ближний Восток и Индостан. Принцип такой двухэтапной экспансии чумы в Азии не соответствует эпизоотологической концепции распространения возбудителя из района видообразования по принципу “расползания масляного пятна по бумаге”.

Во-вторых, важнейшим недостатком МГ подхода на современном этапе является неспособность чисто статистическими методами выявить исходного хозяина возбудителя чумы. Это ключевой вопрос в проблеме филогенеза/филогеографии микроба чумы. Ответ на этот вопрос открывает широкие перспективы для решения проблемы происхождения и внутривидовой диверсификации вида *Y. pestis*. К настоящему времени изучены генетические и нуклеотидные структуры возбудителя из большинства известных природных очагов мира. Предполагается наибольшая древность “полевковых” подвидов 0.PE7 (*Y. pestis tibetica*) или 0.PE2 (*Y. pestis caucasica*) (Cui *et al.*, 2013; Demeure *et al.*, 2019; Pisarenko *et al.*, 2021). Тем не менее выявить исходный подвид чумного микроба и убедительно показать, в популяциях каких грызунов прошло в недавнем прошлом преобразование возбудителя ДСЛ в популяцию возбудителя чумы, МГ методы не могут. МГ подход статистически реконструирует возникновение из клона ДСЛ лишь абстрактного общего предка *Y. pestis* – MRCA. Безликий MRCA охарактеризован только статистически признаками-маркерами. Таким образом, МГ подход на филогенетическом древе *Y. pestis* четко фиксирует анцестральный вид (*Y. pseudotuberculosis*) и его территориальную форму (серотип 0:1b), но уникальные особенности популяционно-генетического процесса, в результате которого возник MRCA, не раскрывает:

это прерогатива экологии. В таком случае выбор общепринятой модели нейтральной эволюции для реконструкции истории чумного микроба видится не вполне убедительным и не обоснованным в должной мере: для характеристики уникального эволюционного процесса – видообразования *Y. pestis* – следует выявить соответствующую ему уникальную, *ad hoc* эволюционную модель (Сунцов, 2022 б).

В-третьих, МГ подход в филогенетике чумного микроба имеет две составляющие – молекулярную и генетическую. И эти составляющие взаимно не согласуются, являются альтернативными, антагонистическими, выглядят обособленно (рис. 1б). Молекулярная методология оперирует “филогенетическими” нуклеотидными признаками-маркерами, которые считают эволюционно нейтральными, их анализ задает топологию филогенетического древа *Y. pestis*. “Нейтральная” эволюция (“нейтральная модель”) характеризует постепенное преобразование таксона путем накопления и закрепления нейтральных мутаций в процессе генетического дрейфа. В то же время генетическая составляющая методологии оперирует “адаптивными” признаками: микроб чумы приобрел специфические факторы вирулентности, трансмиссии и коммуникации (Sun *et al.*, 2014; Hinnebisch *et al.*, 2016; Сунцов, 2021а). При этом генетический подход прокламирует приобретение специфических свойств путем горизонтального переноса цельных генов и сложных генетических структур, в первую очередь специфических плазмид rFga и rPst, из внешней среды или от других микроорганизмов, а также одноактных делеций и инактиваций генов, утративших функции в новой среде обитания. Т.е. прокламируется “эволюционная сальтация”. Возникает вопрос, почему радикальные адаптивные изменения генома чумного микроба не находят отражения в топологии филогенетического древа, созданного на основе “филогенетических” нуклеотидных нейтральных признаков (рис. 1б). Согласно эволюционной логике, при реконструкции филогении *Y. pestis* анализ “филогенетических” и “адаптивных” признаков требует методологического согласования: историю таксонов раскрывают и филогенетические, и адаптивные признаки. В случае молодого возбудителя чумы для реконструкции его уникальной истории не следует ограничиваться анализом консервативных нуклеотидных филогенетических признаков, которые могут свидетельствовать только о длительной эволюционной тенденции “ствола” исследуемой группы кишечных обитателей. Адаптивные признаки, резко отличающие чумного микроба от возбудителей кишечных инфекций, отражают истинную историю чумного микроба, они более показательны и, безусловно, должны участвовать в формировании топологии филогенетического древа.

### “АРХЕОЛОГИЧЕСКАЯ” ДНК В ФИЛОГЕНИИ *Y. PESTIS*

Ископаемые таксоны в классической филогенике исследуемых групп играют ключевую роль, так как представляют корни и ранние ветви филогенетических деревьев. Активное изучение “ископаемых” таксонов чумного микроба в последние 10–15 лет проводят на основе “археологической” ДНК, т.е. по фрагментам ДНК, извлеченным из останков человеческих жертв эпидемий и пандемий, имевших место в Европе и Азии в последние 7–5 тыс. лет (Eaton *et al.*, 2023; Ерошенко и др., 2023). ДНК из палеонтологических находок диких животных не изучали. Обнаруженные многочисленные фрагменты археологической ДНК по нуклеотидной структуре близки гомологичным фрагментам псевдотуберкулезного микроба. Поэтому археологические таксоны Gok2, LNBA и другие, предложенные на основании этих фрагментов, размещают в корне филогенетических деревьев *Y. pestis* (рис. 1 б).

Современных генотипов микроба чумы, имеющих молекулярные маркеры, гомологичные археологическим, не обнаружено, и археологические таксоны/подвиды считают вымершими. Однако известно, что в постледниковой Европе (в голоцене) не было природных условий, удовлетворяющих требованиям для существования природных очагов чумы, не было аридных ландшафтов с многочисленным населением норových грызунов, на которых в массе паразитировали блохи (Stenseth *et al.*, 2022). Обширная аридная Сахаро-Гобийская зона, в которой располагаются многочисленные первичные природные очаги, не проникла в Европу. Поэтому для обоснования каких-либо вымерших естественных линий в филогенезе чумного микроба, вызванных вымиранием хозяев и/или переносчиков возбудителя, нет серьезных эколого-эпизоотических оснований. Исчезнувшие ныне очаги чумы в Европе с большой вероятностью были синантропическими, имели антропогенное (завозное) происхождение.

### МОНГОЛЬСКИЙ СУРОК – ИСХОДНЫЙ ХОЗЯИН ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

В случае недавнего возникновения микроба чумы в почти современной биогеоэкологической обстановке особую ценность в филогенетических реконструкциях приобретает экологический, т.е. адапционистский, подход, который позволяет создать более полноценный, насыщенный биологической информацией исторический нарратив.

Вопрос об исходном хозяине возбудителя чумы – краеугольный в проблеме реконструкции его истории. Выявление первичного хозяина

позволяет точно обозначить исходную форму чумного микроба, что, в свою очередь, позволяет безошибочно формировать монофилетические группы по адаптивным признакам на основе биогеографического распространения и популяционных параметров основных хозяев возбудителя.

Любой видообразовательный процесс вызван изменением среды обитания предковой популяции. Следовательно, недавнее преобразование клона возбудителя ДСЛ в исходную популяцию возбудителя чумы было вызвано изменением среды его обитания, которое привело к изменению жизненного цикла. Возбудитель ДСЛ имеет две среды обитания – внешнюю органику (почву, экскременты, останки животных) и пищеварительный тракт широкого круга беспозвоночных и позвоночных животных. Возбудитель чумы также имеет две среды обитания – организм грызуна-хозяина и организм блохи-переносчика. Основное эволюционное событие при формировании нового вида – чумного микроба – было связано с формированием факторов вирулентности к грызуну-хозяину со стороны микроба, факторов иммунитета к микробу со стороны грызуна-хозяина и факторов трансмиссии через укусы блох, обеспечивающих непрерывную циркуляцию чумного микроба в популяциях грызунов-хозяев (Сунцов, 2021а). Это эволюционное событие, по единодушному мнению исследователей, произошло в популяциях какого-то определенного вида грызуна-хозяина. Краеугольный вопрос: какого? Среди исходных хозяев чумного микроба в МГ подходе не настоячиво, предположительно называют нильскую травяную мышь *Arvicanthus niloticus* (Achtman *et al.*, 1999), сибирского тушканчика *Allactaga sibirica* (Cui *et al.*, 2013), обыкновенную полевку *Microtus arvalis* (Pisarenko *et al.*, 2021), сурков, с большей вероятностью алтайского (Klevytska *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2006; Анисимов и др., 2016). Но экологические сведения указывают, что исходным хозяином чумного микроба с большей вероятностью был монгольский сурок-тарбаган (Сунцов, 2020, 2022а, б).

Исходной средой обитания чумного микроба является, как мы постулируем, паразитарная система монгольский сурок – блоха *Oropsylla silantiewi*. В этой среде в недавнем эволюционном прошлом произошли какие-то необратимые изменения, которые позволили возбудителю ДСЛ внедриться в эту среду и закрепиться в ней в качестве нового патогенного вида *Y. pestis*, образовав исходную эпизоотическую триаду чумы *M. sibirica* – *O. silantiewi* – *Y. pestis*. В таком случае требуется объяснить, какие изменения и под действием каких абиотических и/или биотических факторов позволили внедриться в паразитарную систему *M. sibirica* – *O. silantiewi* будущему возбудителю чумы в недавнем (это важно!) историческом прошлом, не ранее 30 тыс. лет назад.

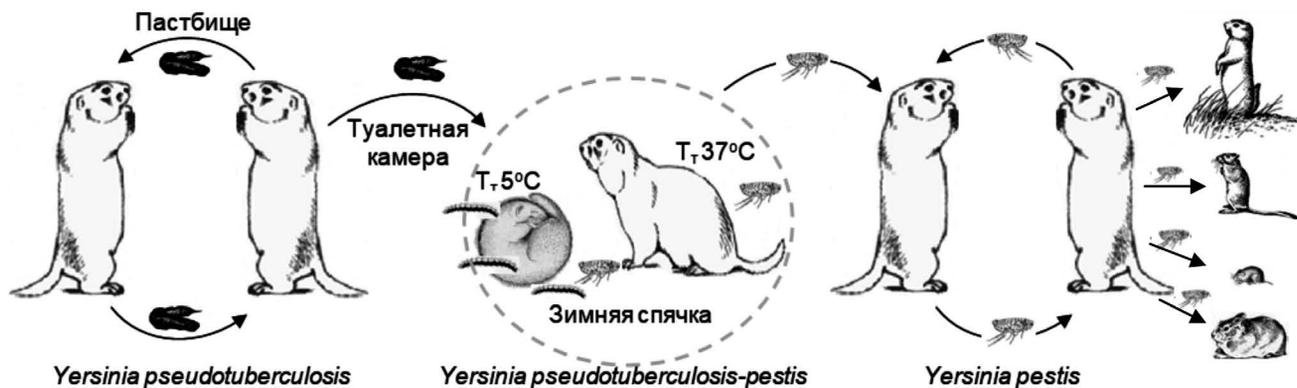
Известно, что внутренняя среда теплокровных животных регулируется механизмами гомеостаза и сохраняет высокую стабильность. Поэтому нет убедительных оснований полагать, что в последние 30 тыс. лет физиологические, биохимические и прочие характеристики кишечной среды обитания псевдотуберкулезного микроба в организме монгольского сурка и любых других основных хозяев чумного микроба претерпели какие-либо радикальные изменения, которые могли бы привести к эволюционному освоению псевдотуберкулезным предком лимфо-миелоидного комплекса теплокровных хозяев через преодоление эпителиального барьера кишечного тракта. В таком случае естественно принять альтернативу, что эволюционный переход псевдотуберкулезного микроба из пищеварительного тракта в лимфо-миелоидный комплекс монгольского сурка был инициирован какими-то внешними, “не кишечными” причинами. Например, регулярное попадание возбудителей сапронозных (кишечных) микробных обитателей в кровь теплокровных хозяев может осуществляться травматическим путем, как это известно для возбудителей столбняка (*Clostridium tetani*) и газовой гангрены (*Clostridium perfringens* и др.). Согласно экологическому сценарию, внешними причинами появления чумы стали два одновременно возникших абиотических фактора — аридность и суровость климата Центральной Азии. Первичной отдаленной абиотической причиной стала аридность климата Центральной Азии, которая установилась десятки миллионов лет назад в олигоцене-миоцене. Фактор сухости климата привел к формированию видоспецифического поведения монгольского сурка, обитающего в ультрааридных ландшафтах Центральной Азии. Только для этого вида характерно защитное поведение при устройстве “пробки” зимовочной норы, которое приводит к накоплению в ротовой полости перед залеганием в спячку собственных экскрементов, а с ними возбудителя ДСЛ, но без проникновения микроба в желудочно-кишечный тракт (сурки в период спячки не питаются) и, соответственно, без развития инфекционного процесса ДСЛ в период спячки (Сунцов, 2022б).

### САРТАНСКОЕ ПОХОЛОДАНИЕ — ТРИГГЕР ВИДООБРАЗОВАНИЯ МИКРОБА ЧУМЫ

Накопление возбудителя ДСЛ в ротовой полости монгольского сурка в период спячки было лишь отдаленной предпосылкой видообразования микроба чумы. Реальным триггером видообразовательного процесса стало последнее максимальное (сартанское) похолодание в Северной и Центральной Азии и на Дальнем Востоке на рубеже плейстоцена и голоцена 22–15 тыс. лет назад. Максимальное

похолодание в Монголии привело к глубокому промерзанию почво-грунтов, 2 м и более (Owen *et al.*, 1998), что стало причиной изменения поведения личинок сурковой блохи *O. silantiewi* — возникновения в зимне-весенние месяцы факультативной гематофагии. Т.е. блошинные личинки в холодных условиях стали питаться кровью на спящих и малоактивных хозяевах. Это поведение личинок проявляется до сих пор, и его можно наблюдать в реальном времени (Сунцов, 2018а). Известен случай изоляции возбудителя чумы от личинок блохи *O. silantiewi*, собранных с малоподвижных зараженных чумой монгольских сурчат на Хангае (Монголия) (Демидова, Емельянова, 1971). В обычных условиях блошинные личинки питаются детритом в подземных гнездах сурков. Паразитизм личинок сурковой блохи на монгольском сурке не является глубокой адаптацией, наблюдается только в холодное время года (январь — март), проявляется лишь как факультативное стохастическое явление и обусловлено простейшей поведенческой реакцией — положительным термотаксисом. Зимой, когда грунт промерзает до глубины размещения гнездовых зимовочных камер монгольского сурка (2.0–2.5 м), личинки из промерзлой (до  $-8^{\circ}\text{C}$ ) гнездовой выстилки переходят на более теплые тела спящих зверьков, имеющих температуру тела в торпорном состоянии около  $5^{\circ}\text{C}$ . В процессе перемещений в шерсти животных личинки со стохастической закономерностью попадают в ротовую полость, где, создавая скарификации, питаются на слизистой выступающей кровью. Таким образом, благодаря факультативному поведению сурковых блох — питанию кровью на ранах в ротовой полости — возбудитель ДСЛ получил возможность проникать травматическим путем из ротовой полости спящих сурков напрямую в кровь и в общепопуляционном масштабе вызывать тривиальное “заражение крови”. Уникальный раневый способ заражения популяций монгольского сурка кишечным возбудителем ДСЛ стал причиной его быстрого “квантового” перехода в новую экологическую нишу — лимфо-миелоидную систему монгольского сурка с преобразованием в возбудителя чумы *Y. pestis* (рис. 2) (Сунцов, 2018б).

Важнейшим фактором быстрого “квантового” видообразования, надо полагать, стало направленное изменение генома возбудителя ДСЛ, т.е. своего рода ортогенетический фактор, направлявший отбор по признаку нарастающей устойчивости микроба к нарастающей иммунной активности гетеротермных ( $5-37^{\circ}\text{C}$ ) и, соответственно, гетероиммунных сурков во время зимней спячки (Сунцов, 2018б; 2019). У зимоспящих животных (сурков, сусликов) в периоды глубокого сна температура тела падает до  $2-5^{\circ}\text{C}$  и активность иммунных процессов резко снижается. Животные в этом состоянии восприимчивы к инфекциям и легко могут быть инфицированы. В эутермном



**Рис. 2.** Переход клона возбудителя дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки (ДСЛ) *Yersinia pseudotuberculosis* 0:1b в новую экологическую нишу и преобразование в популяцию возбудителя чумы *Y. pestis* в популяциях гетеротермных (гетероиммунных) монгольских сурков в период зимней спячки. Источником заражения ДСЛ накануне спячки стало содержимое туалетных камер в зимовочных норах сурка.  $T_r$  – температура тела сурков в торпорном и эутермном состояниях. Справа стрелками показан переход возбудителя чумы в симпатрические популяции сусликов, песчанок, полевок и пищух.

состоянии (37°C) иммунные процессы нормализуются и инфекционные процессы в иммунокомпетентных организмах подавляются (Prendergast *et al.*, 2002). Именно в направлении преодоления иммунной компетентности активных сурков проходил отбор в клоне псевдотуберкулезного предка чумного микроба.

### ПЕРИПАТРИЧЕСКОЕ ВИДООБРАЗОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

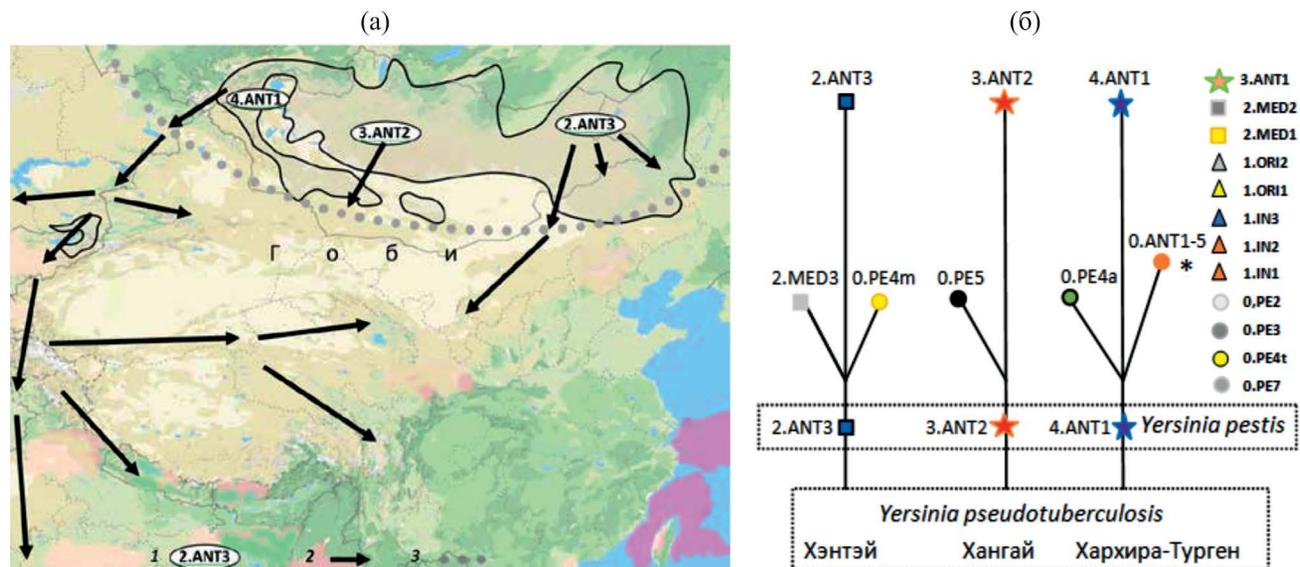
Зная характеристики популяций исходного хозяина, в которых прошло преобразование кишечного возбудителя ДСЛ в “кровяного” паразита, и принимая во внимание факты эволюционной молодости чумного микроба и его сосуществование с прямым предком, эволюционную историю возбудителя чумы мы можем полноценно реконструировать экологическими (в широком понимании) методами. Ареал монгольского сурка в Центральной Азии формируют три географические популяции. Подвид *M. sibirica sibirica* заселяет нагорье Хэнтэй на востоке Монголии, Баргинские степи и западные склоны Большого Хингана в северо-восточном Китае. Подвид *M. sibirica caliginosus* обитает на Хангайском горном поднятии в центральной Монголии. Третий, пока не описанный, подвид *M. sibirica ssp* заселяет Хархира-Турген-Монгун-Тайгинский горный комплекс на западе Монголии, заходит в Тыву. Сартанское похолодание охватило целиком Центральную Азию, и, надо полагать, формирование чумного микроба как вида *Y. pestis* прошло (почти) одновременно, параллельно в трех географических популяциях монгольского сурка

с образованием трех географических популяций (подвидов, геновариантов) 2.ANT3 (Хэнтэй, Хинган, Барга), 3.ANT2 (Хангай) и 4.ANT1 (Хархира-Турген-Монгун-Тайга) (Сунцов, 2020, 2021а, б).

Возникновение вида *Y. pestis* из трех самостоятельных популяций возбудителя ДСЛ следует характеризовать как политопное перипатрическое (парапатрическое?) видообразование (Сунцов, 2020, 2021б). Дальнейшая территориальная экспансия и гостальная специализация проходили самостоятельными маршрутами, и образовались три самостоятельных (почти), не перекрывающихся зоны первичных природных очагов в Азии и на юго-востоке Европы (рис. 3а). Таким образом, вид *Y. pestis* представляет не одну монофилетическую группу таксонов (подвидов), а парафилетическую (или полифилетическую?) группу, состоящую из трех голофилетических самостоятельных групп. Сходство этих трех голофилетических групп по нуклеотидным признакам-маркерам, надо полагать, связано с параллелизмами, возникающими при однонаправленной эволюции популяций в сходных условиях (рис. 3б) (Сунцов, 2023). Если это так, то гомоплазийное сходство трех голофилетических групп предопределяет необходимость разработки уникальной, *ad hoc* модели эволюции анализируемых молекулярных признаков, в которой родство трех голофилетических групп опосредовано псевдотуберкулезным предком.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Знание прямого предка и исходного хозяина микроба чумы, а также твердо установленный факт его дивергенции в недавнем геологическом



**Рис. 3.** Формирование трех геновариантов/подвидов *Yersinia pestis* 2.ANT3, 3.ANT2 и 4.ANT1 в трех географических популяциях монгольского сурка *M. sibirica sibirica* (Хэнтэй, Барга, Хинган), *M. sibirica caliginosus* (Хангай) и *M. sibirica ssp.* (Хархира, Турген, Монгун-Тайга) соответственно (по: Сунцов, 2020). (а) – три самостоятельных маршрута территориальной экспансии трех подвидов возбудителя чумы. 1 – районы формирования исходных подвидов *Y. pestis*. 2 – направления экспансии исходных подвидов. 3 – южная граница “вечной мерзлоты”, характеризующая границу сарганского похолодания. (б) – трехкорневое филогенетическое древо *Y. pestis*, построенное на основе экологического сценария видообразования возбудителя чумы. Цветные значки отражают политипическую структуру вида *Y. pestis*.

прошлом при уникальных экологических обстоятельствах позволяют создать сценарий филогенеза *Y. pestis* по экологическим и биогеографическим данным, не прибегая в этом уникальном случае к сложным молекулярно-стохастическим технологиям. ЭКО данные приводят к заключению о быстром “квантовом” тритоном видообразовании микроба чумы в трех географических популяциях монгольского сурка. Переход исходных геновариантов/подвидов 2.ANT3, 3.ANT2 и 4.ANT1 из популяций монгольского сурка в симпатрические с ними популяции других видов хозяев осуществлялся по принципу “распространения масляного пятна на бумаге”. Адаптация к новым хозяевам привела к формированию новых гостальных подвидов. При этом так называемые “полевковые” подвиды сформировались вторично в разных географических районах от разных предковых форм в популяциях основных хозяев разных видов.

Топология филогенетического древа *Y. pestis*, предложенная ЭКО подходом, имеет принципиальное отличие от древовидных монофилетических топологий, полученных с применением молекулярных технологий и модели нейтральной эволюции. Но история чумного микроба инвариантна. В таком случае ближайшей задачей филогенетических, филогеографических

и экологических исследований возбудителя чумы следует ставить согласование МГ и ЭКО методологий. Видообразование и экспансия микроба чумы – это во многом разные процессы. Видообразование – “квантовый” популяционно-генетический процесс перехода эволюционирующей группы (таксона) в принципиально иную экологическую нишу и адаптивную зону, т.е. процесс, имевший макроэволюционный эффект. Экспансия – это постепенный микроэволюционный процесс с частыми случаями “бутылочного горлышка” при переходе в популяции нового хозяина. В связи с этим базовая модель эволюции признаков в филогенетических построениях должна быть дуалистичной, *ad hoc* моделью, объясняющей не только действующие, но и начальные причины формирования внутривидового разнообразия *Y. pestis*. Параметры модели должны быть адекватны двум разным эволюционным событиям, приведшим сначала к образованию трех исходных подвидов/геновариантов *Y. pestis* в природе Центральной Азии, а затем к их дальнейшей мировой территориальной экспансии и внутривидовой диверсификации в популяциях норových грызунов аридных ландшафтов, а в новое время – в популяциях синантропных грызунов.

Сценарии происхождения и внутривидовой диверсификации возбудителя чумы, построенные

как на основе МГ, так и ЭКО подходов, пока остаются несовершенными, имеют свои преимущества и недостатки. Но экологический сценарий, представляющий собой гипотезу-презумпцию, пока видится менее противоречивым, и его следует принять в качестве экологической основы и эволюционной модели для дальнейших исследований по проблеме происхождения чумы.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в соответствии с планом НИР Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН за счет бюджетных средств.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор подтверждает отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Анисимов Н.В., Кисличкина А.А., Платонов М.Е., Евсеева Е.Е., Кадникова Л.А., Липатникова Н.А., Богун А.Г., Денцовская С.В., Анисимов А.П. О происхождении гипервирулентности возбудителя чумы // Мед. паразитол. паразит. болезни. 2016. № 1. С. 36–42.
- Демидова Е.К., Емельянова Н.Д. Случай выделения микроба чумы от личинок блох *Oropsylla silantiewi* W., инфицированных в естественных условиях // Докл. Иркутск. противочумн. ин-та. 1971. № 9. С. 231–232.
- Ерошенко Г.А., Батиева Е.Ф., Кутырев В.В. Палеогеномика возбудителя чумы и перспективы палеогеномных исследований на территории России // Пробл. особо опасн. инф. 2023. № 2. С. 13–28. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-13-28
- Кисличкина А.А., Платонов М.Е., Вагайская А.С., Богун А.Г., Денцовская С.В. Рациональная таксономия *Yersinia pestis* // Мол. генетика, микробиол. вирусол. 2019. Т. 37. № 2. С. 76–82. DOI.org/10.17116/molgen20193702176
- Сомов Г.П. Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка. М.: Медицина. 1979. 184 с.
- Сунцов В.В. Исключительная роль специфической блохи сурков *Oropsylla silantiewi* (Ceratophyllidae: Siphonaptera) в видообразовании возбудителя чумы – микроба *Yersinia pestis* // Паразитология. 2018а. Т. 52. № 1. С. 3–18.
- Сунцов В.В. Квантовое видообразование микроба чумы *Yersinia pestis* в гетероиммунной среде – популяциях гибернарующих сурков-тарбаганов (*Marmota sibirica*) // Сиб. экол. журн. 2018б. № 4. С. 381–396. DOI: 10.15372/SEJ20180401
- Сунцов В.В. Происхождение чумы. Перспективы эколого-молекулярно-генетического синтеза // Вестник РАН. 2019. Т. 89. № 3. С. 260–269. DOI.org/10.31857/S0869-5873893260-269
- Сунцов В.В. Гостальный аспект территориальной экспансии микроба чумы *Yersinia pestis* из популяций монгольского сурка-тарбагана (*Marmota sibirica*) // Зоол. журн. 2020. Т. 99. № 11. С. 1307–1320. DOI: 10.31857/S0044513420090160
- Сунцов В.В. Геномодивергенез микроба чумы *Yersinia pestis* как процесс мозаичной эволюции // Генетика. 2021а. Т. 57. № 2. С. 140–154. DOI: 10.31857/S0016675821020119
- Сунцов В.В. Политопное видообразование микроба чумы *Yersinia pestis* как причина филогенетической трихотомии в географических популяциях монгольского сурка-тарбагана (*Marmota sibirica*) // Журн. общей биол. 2021б. Т. 82. № 6. С. 431–444. DOI: 10.31857/S0044459621060075
- Сунцов В.В. Климатические изменения в Центральной Азии как предпосылки и триггер видообразования микроба чумы *Yersinia pestis* // Сиб. экол. журн. 2022а. № 4. С. 451–463. DOI 10.15372/SEJ20220406
- Сунцов В.В. Филогенез микроба чумы *Yersinia pestis*: уникальность эволюционной модели // Вестник РАН. 2022б. Т. 92. № 9. С. 860–868. DOI: 10.31857/S0869587322090092
- Сунцов В.В. Параллелизмы в видообразовании и внутривидовой диверсификации микроба чумы *Yersinia pestis* // Изв. РАН. Сер. биол. 2023; 2: 115–121. DOI: 10.31857/S1026347023010122
- Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis* // PNAS. 1999. V. 96. № 24. P. 14043–14048.
- Achtman M., Morelli G., Zhu P., Wirth T., Diehl I., Kusecek B., Vogler A.J., Wagner D.M., Allender C.J., Easterday W.R., Chenal-Francois V., Worsham P., Thomson N.R., Parkhill J., Lindler L.E., Carniel E., Keim P. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis* // PNAS. 2004. V. 101. № 51. P. 17837–17842. DOI: 10.1073\_pnas.0408026101
- Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., et al. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis* // PNAS. 2013. V. 110. № 2. P. 577–582. DOI 10.1073/pnas.1205750110

- Demeure C.E., Dussurget O., Fiol G.M., Guern S., Savin C., Pizarro-Cerdá J. *Yersinia pestis* and plague: An updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnostics // *Genes Immun.* 2019. V. 20. № 5. P. 357–370. DOI.org/10.1038/s41435-019-0065-0
- Eaton K., Featherstone L., Duchene S., et al. Plagued by a cryptic clock: insight and issues from the global phylogeny of *Yersinia pestis* // *Commun. Biol.* 2023. V. 6. № 23. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04394-6>
- Fukushima H., Matsuda Y., Seki R., Tsubokura M., Take-da N., Shubin F.N., Paik I.K., Zheng X.B. Geographical Heterogeneity between Far Eastern and Western Countries in Prevalence of the Virulence Plasmid, the Superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-Derived Mitogen, and the High-Pathogenicity Island among *Yersinia pseudotuberculosis* Strains // *J. Clin. Microbiol.* 2001. V. 39. № 10. P. 3541–3547. DOI: 10.1128/JCM.39.10.3541–3547.2001
- Hinnebusch B.J., Chouikha I., Sun Y.-C. Ecological Opportunity, Evolution, and the Emergence of Flea-Borne Plague // *Inf. Immun.* 2016. V. 84. № 7. P. 1932–1940. DOI:10.1128/IAI.00188-16
- Klevytska A.M., Price L.B., Schupp J.M., Worsham P.L., Wong J., Keim P. Identification and Characterization of Variable-Number Tandem Repeats in the *Yersinia pestis* Genome // *J. Clin. Microbiol.* 2001. V. 39. № 9. P. 3179–3185. DOI: 10.1128/JCM.39.9.3179–3185.2001
- Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'khoa Z.V., Oglodin E.G., Guseva N.P. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States // *Front. Microbiol.* 2018. № 9. Art. 1106. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01106>
- Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Roumagnac P., et al. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity // *Nature Genetics.* 2010. V. 42. № 12. P. 1140–1145. DOI:10.1038/ng.705
- Owen L.A., Richards B., Rhodes E.J., Cunningham W.D., Windley B.F., Badamgarav J., Dorjnamjaa D. Relict permafrost structures in the Gobi of Mongolia: Age and significance // *J. Quat. Sci.* 1998. № 6. P. 539–547.
- Pisarenko S.V., Evchenko A.Yu., Kovalev D.A., Evchenko Y.M., Bobrysheva O.V., Shapakov N.A., Volynkina A.S., Kulichenko A.N. *Yersinia pestis* strains isolated in natural plague foci of Caucasus and Transcaucasia in the context of the global evolution of species // *Genomics.* 2021. № 113. P. 1952–1961. DOI.org/10.1016/j.ygeno.2021.04.021
- Prendergast B.J., Freeman D.A., Zucker I., Nelson R.J. Periodic arousal from hibernation is necessary for initiation of immune responses in ground squirrels // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp.* 2002. V. 282. № 4. P. 1054–1062. DOI: 10.1152/ajpregu.00562.2001
- Skurnik M., Peippo A., Ervela E. Characterization of the O-antigen gene cluster of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b // *Mol. Microbiol.* 2000. V. 37. № 2. P. 316–330.
- Stenseth N.C., Taoc Y., Zhang C., Bramanti B., Büntgen U., Cong X., Cui Y., et al. No evidence for persistent natural plague reservoirs in historical and modern Europe // *PNAS.* 2022. V. 119. № 51. <https://doi.org/10.1073/pnas.2209816119>.
- Sun Y.-C., Jarrett C.O., Bosio C.F., Hinnebusch B.J. Retracing the Evolutionary Path that Led to Flea-Borne Transmission of *Yersinia pestis* // *Cell Host & Microbe.* 2014. № 15. P. 578–586. DOI.org/10.1016/j.chom.2014.04.003
- Wang X., Zhou D., Qin L., Dai E., Zhang J., Han Y., Guo Z., Song Y., Du Z., Wang Ji., Wang Ju., Yang R. Genomic comparison of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* by combination of suppression subtractive hybridization and DNA microarray // *Arch. Microbiol.* 2006. № 186. P. 151–159. DOI 10.1007/s00203-006-0129-1
- Wu Y., Hao T., Qian X., Zhang X., Song Y., Yang R., Cui Y. Small Insertions and Deletions Drive Genomic Plasticity during Adaptive Evolution of *Yersinia pestis* // *Microbiology Spectrum.* 2022. V. 10. № 3. e02242-21 <https://doi.org/10.1128/spectrum.02242-21>

## Uniqueness and phylogenesis of the plague microbe *Yersinia pestis*

V. V. Suntsov

*Institute of Problems of Ecology and Evolution named after. A.N. Severtsov RAS,  
Leninsky Prospekt, 33, Moscow, 119071 Russia  
E-mail: vvsuntsov@rambler.ru*

The phylogenies of the plague microbe (*Yersinia pestis*), reconstructed on the basis of an advanced molecular genetic (MG) approach, are not congruent with the facts accumulated by classical scientific areas: ecology, biogeography, paleontology, epizootiology, and others. The MG approach cannot name the original host of the plague pathogen and reliably characterize the root of the phylogenetic tree. This deficiency is compensated by the ecologic in a broad sense (ECO) approach, which operates with

such ecological, phylogeographic and biogeographic categories as geographical population, subspecies, range, ecological niche, direct kinship. *Y. pestis*, the “blood dweller” of warm-blooded rodent hosts, is transmitted through flea bites and is unique in the family of predominantly intestinal bacteria *Yersiniaceae* (*Enterobacteriaceae*). According to the ECO approach, its uniqueness is associated with the origin in the populations of its primary host – Mongolian marmot (*Marmota sibirica*) in unique circumstances – when the marmot population was infected with pseudotuberculosis not by the traditional alimentary way in grasslands, but in a traumatic way during hibernation. The identification of the original host of the plague pathogen opens up broad prospects for studying its evolutionary history (speciation and intraspecific diversification) and improving the methodology of ecologic, geographic, phylogeographic and phylogenetic studies of this especially dangerous pathogen.

*Keywords:* *Yersinia pseudotuberculosis* 0:1b, *Yersinia pestis*, peripatric speciation, phylogeny, phylogeography, evolutionary model, ecological scenario

УДК [597.552.511:639.33]: 577.115 + 577.15

## ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ РЕЖИМОВ ОСВЕЩЕНИЯ И КОРМЛЕНИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ *FADSD5*, *FADSD6*, *ELOVL2*, *ELOVL5A* ДЕСАТУРАЗ И ЭЛОНГАЗ В ПЕЧЕНИ МОЛОДИ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ *SALMO SALAR* L. В УСЛОВИЯХ АКВАКУЛЬТУРЫ

© 2024 г. С. Н. Хуртина<sup>®</sup>, С. А. Мурзина, М. В. Кузнецова, Н. Н. Немова

Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”,  
ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск, 185910 Россия  
<sup>®</sup>E-mail: pek-svetlana@mail.ru

Поступила в редакцию 16.02.2024 г.

После доработки 11.06.2024 г.

Принята к публикации 14.06.2024 г.

Проведен анализ относительного уровня экспрессии генов ферментов – десатураз и элонгаз (*fadsd5*, *fadsd6*, *elovl2*, *elovl5a*, *elovl4*), являющихся ключевыми в биосинтезе длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот, в печени молоди атлантического лосося *Salmo salar* Linnaeus, 1758, содержащегося при разных режимах освещения и кормления в условиях аквакультуры. Установлено, что в марте у смолтов атлантического лосося (0+), выращиваемых при круглосуточном освещении и кормлении, уровень экспрессии гена *fadsd5* десатуразы был выше, чем у рыб, содержащихся при естественном режиме освещения и кормления в светлое время суток. Изменения в экспрессии генов (*elovl2*, *elovl5a*, *fadsd5*) у молоди лосося отражают адаптивные процессы на молекулярно-генетическом уровне в процессе роста и развития рыб и в ответ на изменения условий окружающей среды. Полученные результаты позволяют оценить способность/потребность молоди лосося к биосинтезу ПНЖК в процессе роста и развития.

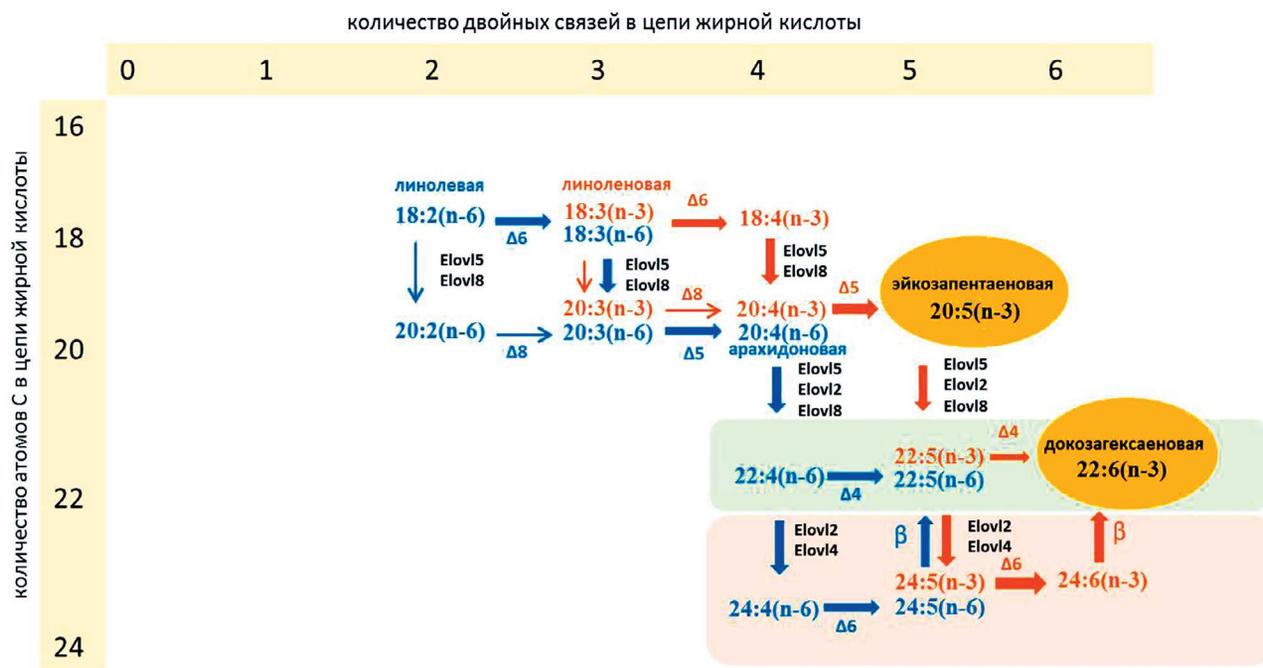
**Ключевые слова:** атлантический лосось, экспрессия генов, десатуразы, элонгазы, жирные кислоты, смолтификация, раннее развитие, аквакультура

**DOI:** 10.31857/S1026347024060024, **EDN:** ukzcgq

Липиды и жирные кислоты (ЖК) играют незаменимую роль в процессах роста и развития организмов, в том числе рыб, как в естественной среде, так и в условиях аквакультуры (Tocher *et al.*, 2003; Мурзина и др., 2009, 2023а,б; Немова и др., 2015; Nemova *et al.*, 2020). Атлантический лосось *Salmo salar* Linnaeus, 1758, является значимым объектом аквакультуры и источником физиологически ценных полиненасыщенных ЖК (ПНЖК). Известно, что представители пресноводных и анадромных рыб из сем. Лососевые способны к биосинтезу длинноцепочечных ПНЖК, в том числе эссенциальных эйкозапентаеновой 20:5(n-3) (ЭПК) и докозагексаеновой 22:6(n-3) (ДГК) ЖК (Morais *et al.*, 2009; Tocher, 2010), тогда как большинство морских костистых рыб не могут образовывать длинноцепочечные ПНЖК (или имеют ограниченную способность), получая их в достаточном количестве при питании (Tocher *et al.*, 2010). Биосинтез

ПНЖК у позвоночных животных, в том числе рыб, включает последовательные этапы десатурации (добавление двойной связи) и элонгации (удлинения цепи) незаменимых линолевой 18:2(n-6) и линоленовой 18:3(n-3) ЖК (Tocher, 2010; Monroig *et al.*, 2011, 2022; Xie *et al.*, 2021;) (рис. 1). Он проходит в организме посредством согласованного действия двух наборов ферментов, а именно десатураз и элонгаз, обладающих различной активностью и субстратной специфичностью (Guillou *et al.*, 2010).

Известно, что у атлантического лосося уровень экспрессии гена фермента десатуразы Δ6 выше в мозге, кишечнике и печени (Monroig *et al.*, 2010). Гены элонгаз активно экспрессируются в печени и кишечнике лосося (Zheng *et al.*, 2005а; Morais *et al.*, 2009), поскольку ткани этих органов являются основными местами синтеза и распределения липидов. Большая часть исследований биосинтеза



**Рис. 1.** Пути биосинтеза длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот у костистых рыб.

β – β окисление, Δ4/5/6/8 – десатураза с активностью Δ4/5/6/8; Elovl 2/4/5/8 – элонгаза с активностью 2/4/5/8. Оранжевая область – биосинтез длинноцепочечных ПНЖК по пути Шпрехера, зеленая область – биосинтез 22:6(n-3) и 22:5(n-6) с участием десатуразы Δ4.

ПНЖК *S. salar* направлена в основном на изучение экспрессии генов десатураз и элонгаз под действием таких факторов окружающей среды, как рацион питания (Morais *et al.*, 2009; Vestergren *et al.*, 2011; Vestergren, 2012; Miao *et al.*, 2022) или температура (Norambuena *et al.*, 2015). Следует отметить, что практически отсутствуют сведения о влиянии на экспрессию генов ферментов липогенеза таких, не менее значимых (особенно для аквакультуры) факторов, как линейный и весовой рост и фотопериод. При этом известно, что искусственно продленный фотопериод, используемый при выращивании молоди атлантического лосося, повышает темпы его роста (Hansen *et al.*, 1992; Berrill *et al.*, 2003, 2006; Leclercq *et al.*, 2011; Noori *et al.*, 2015; Imsland *et al.*, 2017; Шульгина и др., 2021). Исследования биосинтеза ПНЖК у *S. salar* не только важны с точки зрения получения новых сведений о молекулярных механизмах этого процесса при воздействии различных факторов среды, но и могут быть востребованы для усовершенствования биотехники выращивания и, в конечном итоге, улучшения качества продукции ценных рыб сем. Лососевые (Jakobsson *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2004, 2005a, b; Leaver *et al.*, 2008; Bláhová *et al.*, 2020; Monroig *et al.*, 2022).

Ранее было установлено совокупное влияние фотопериода и кормления в круглосуточном режиме

на липидный профиль молоди *S. salar*, выращиваемого в аквакультуре в одном из южных регионов России (Северной Осетии – Алании) в летне-осенний период (Мурзина и др., 2023а, б). Показано, что процесс превращения пестряток в смолтов у лосося в условиях аквакультуры под воздействием постоянного освещения может происходить гораздо раньше (в возрасте 0+ и 1+) по сравнению с особями из естественной среды обитания (около 2+, 3+), что было подтверждено в наших исследованиях (Эколого-биохимический статус..., 2016; Мурзина и др., 2023а, б).

Для сохранения естественных циркадных ритмов лосося в условиях искусственного разведения при использовании постоянного освещения важным является соблюдение сезонного фотопериодизма, а именно наличия “зимнего окна” (воздействие короткого фотопериода с последующим увеличением его продолжительности). Это, в целом, способствует поддержанию оптимального хода обменных процессов и завершению значимых морфо-физиологических и биохимических адаптивных изменений в организме рыбы, происходящих при трансформации пестряток в смолтов (Villareal *et al.*, 1988; Björnsson *et al.*, 2011; Власов и др., 2013).

Целью данной работы являлся анализ уровня экспрессии ключевых генов (*fadsd5*, *fadsd6*, *elovl2*,

*elov15a*, *elov14*) ферментов биосинтеза ПНЖК, элонгаз и десатураз, в печени молоди атлантического лосося, выращиваемой при разных режимах освещения и кормления в условиях аквакультуры в период после т.н. “зимнего окна”.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали молодь (пестряток (0+) и смолтов (0+, 1+) атлантического лосося *S. salar* L., выращиваемого в условиях южного региона на рыбноводном хозяйстве ООО “Остров Аквакультура” (Республика Северная Осетия – Алания, Россия) согласно следующей схеме эксперимента. Сеголетки атлантического лосося (после перехода на экзогенное питание) были помещены в бассейны с непрерывным освещением (24LD) с использованием светодиодных осветителей LED (36W, 6500K) для стимуляции эндогенных механизмов, влияющих на ростовые процессы. В августе (2022) сеголеток средней массой 2.3 г пересадили в выростные лотки размером 4x1.2 м, объемом 2.5–2.7 м<sup>3</sup>, в количестве 4900 особей/лоток. С начала сентября сеголеток разделили на три группы по 2 лотка и стали содержать в следующих (экспериментальных) условиях:

1. Группа “24LD+КК”: режим освещения постоянный (24LD), кормление круглосуточное (КК).

2. Группа “ЕстLD+КД”: естественное освещение (ЕстLD), кормление проводилось в светлое время суток (с 06:00 до 18:00 в сентябре, с 08:00 до 18:00 в октябре, с 08:00 до 17:00 в ноябре), через каждые два часа (КД).

3. Группа “24LD+КД”: режим освещения постоянный (24LD), кормление проводилось только в светлое время суток (КД), как у рыб из группы “ЕстLD+КД”.

С начала декабря подростную молодь, согласно экспериментальным группам, перенесли

в круглые бассейны объемом 3.1 м<sup>3</sup> (диаметром 2 м, высотой 1 м) в количестве в среднем 2800 на бассейн. С декабря по март дополнительное освещение не применялось – упомянутое выше “зимнее окно”. Далее выращивание пестряток и смолтов проходило в условиях естественного освещения региона. Условия дневного освещения: 5500 lx, в пасмурную погоду – 500 lx. С середины июня все группы лосося были объединены и высажены в лоток размером 30\*3 метра, общим объемом 150 м<sup>3</sup> и подачей воды из родника с естественным ходом температур, с естественным световым режимом и кормлением в светлое время суток. При этом средняя температура воды в августе была значительно выше (16 °С), чем в марте (11 °С).

Для анализа отбирали по 8 особей из каждой экспериментальной группы (“24LD+КК”, “ЕстLD+КД”, “24LD+КД”) в марте и 15 особей в августе. Образцы печени взвешивали, фиксировали в жидкий азот и хранили при температуре –80 °С до начала анализа. Для молекулярно-генетического анализа брали печень молоди атлантического лосося в марте (пестрятки и смолты возраста 0+) и в августе (смолты 1+).

Выделение РНК из печени лосося проводили с использованием набора “Extract RNA” (“Евроген”, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Затем суммарную РНК обрабатывали ДНКазой (“Силекс”, Россия). Целостность и качество РНК оценивали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле и спектрофотометрически при коэффициенте поглощения 260/280 нм (NanoPhotometer C40-Touch, Implen, Германия). Обратную транскрипцию проводили с применением набора “MMLV RT kit” (“Евроген”, Россия). В дальнейшем синтезированную кДНК использовали в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Анализ проводили с использованием системы CFX96 Touch system (BioRad, США).

**Таблица 1.** Олигонуклеотидные праймеры, используемые для амплификации в ПЦР-РВ

Ген	Последовательность 5'–3'	Номер в GenBank Acc. no
<i>ef1a</i> фактор элонгации 1α	F: CACCACCGGCCATCTGATCTACAA R: TCAGCAGCCTCCTTCTCGAACTTC	AF321836
<i>fadsd5</i> десатураза Δ5	F: GAGAGCTGGCACCCGACAGAG R: GAGCTGCATTTTTCCCATGG	AF478472
<i>fadsd6</i> десатураза Δ6	F: AGAGCGTAGCTGACACAGCG R: TCCTCGGTTCTCTCTGCTCC	AY458652
<i>elov15a</i> элонгаза 5a	F: ACAAGACAGGAATCTCTTTTCAGATTA R: TCTGGGGTTACTGTGCTATAGTGAC	AY170327
<i>elov12</i> элонгаза 2	F: CGGGTACAAAATGTGCTGGT R: TCTGTTTGCCGATAGCCATT	TC91192
<i>elov14</i> элонгаза 4	F: GAGGACCGTGGGGTGAAAAG R: CACTTGTCAATTGTTCTGCACT	NM_001195552.1

Праймеры к исследуемым генам ферментов денатурации и элонгации *fadsd5*, *fadsd6*, *elovl2*, *elovl5a*, *elovl4* (табл. 1) у *S. salar* L для ПЦР-РВ были подобраны на основе данных литературы (Vestergren, 2012; Norambuena *et al.*, 2015), а также с применением программы nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Амплификацию 3 мкл кДНК проводили с использованием 5 мкл набора “5x Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I” (“Евроген”, Россия). Реакционную смесь инкубировали при температуре 95 °С в течение 5 минут и далее 40 циклов при следующих условиях: денатурация при 95 °С в течение 20 секунд, отжиг при 60 °С в течение 30 секунд и элонгация при 72 °С в течение 30 секунд. Специфичность реакции ПЦР проверяли по кривым плавления, полученным в соответствии с протоколом диссоциации от 65 °С до 97 °С. Ген фактора элонгации 1 (*ef1a*) был выбран в качестве референсного за счет стабильности экспрессии, в том числе в тканях печени и по образцу предыдущих исследований (Morais *et al.*, 2009; Vestergren, 2012). Относительный уровень экспрессии исследуемых генов был подсчитан с использованием метода  $2^{-\Delta C_t}$  (Livak, Schmittgen, 2001), где  $\Delta C_t$  – разница между средними значениями пороговых циклов для референсного (*ef1a*) и целевого генов. Данные выражали в единицах относительной экспрессии исследуемого гена (у.ед.).

Статистическая обработка данных проведена в открытой программируемой среде R. Достоверность различий определяли с использованием непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Различия между значениями исследуемых показателей считали достоверными при  $p \leq 0.05$ . Сравнение данных по относительному уровню экспрессии исследуемых генов для смолтов лосося (1+) в августе проведено со значениями, полученными для всех смолтов (0+) лосося в марте,

без разделения по принадлежности к экспериментальной группе. Биохимический анализ выполнен на базе лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН с использованием оборудования ЦКП Федерального исследовательского центра «КарНЦ РАН».

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установлено, что относительный уровень экспрессии гена десатуразы *fadsd5* в печени смолтов (0+) в марте из группы “24LD+КК” (круглосуточное освещение и кормление) был достоверно выше ( $p = 0.02$ ) по сравнению со значениями для группы “ЕстLD+КД” (естественное освещение и кормление в светлое время суток) (табл. 2).

Относительный уровень экспрессии *fadsd6* был выше у пестряток и у смолтов из группы “24LD+КК” по сравнению с другими группами рыб, однако достоверных различий между значениями установлено не было (табл. 2).

Значения относительного уровня экспрессии *elovl2* у смолтов лосося (0+) из группы “24LD+КК” в марте были выше, чем у пестряток ( $p = 0.03$ ) (табл. 2). Различий по относительному уровню экспрессии *elovl5a* между экспериментальными группами у пестряток и у смолтов в марте установлено не было. Показано, что относительный уровень экспрессии гена *elovl4* стремился к нулю как у пестряток, так и у смолтов (пороговый уровень  $C_T > 33$ ), в связи с этим полученные по этому гену данные не использовались в сравнительном аспекте.

Установлено, что у смолтов лосося в августе относительный уровень экспрессии генов *fadsd5* (0.28 vs 0.20,  $p = 0.02$ ) и *elovl5a* (0.51 vs 0.32,  $p = 0.001$ ) был выше по сравнению с таковым у смолтов в марте, тогда как *elovl2* наоборот был ниже (0.05 vs 0.17,  $p = 0.00001$ ) (рис. 2).

**Таблица 2.** Относительный уровень экспрессии генов (у. уд.) *fadsd5*, *fadsd6*, *elovl2*, *elovl5a* в печени пестряток и смолтов (0+) атлантического лосося в марте, выращиваемого в группах с разными режимами освещения и кормления

Ген	Пестрятки			Смолты		
	24LD+ КК	ЕстLD+ КД	24LD+ КД	24LD+ КК	ЕстLD+ КД	24LD+ КД
	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8
<i>fadsd5</i>	0.16 ± 0.03	0.17 ± 0.04	0.12 ± 0.03	0.25 ± 0.05	0.13 ± 0.02*	0.22 ± 0.04
<i>fadsd6</i>	0.46 ± 0.12	0.25 ± 0.08	0.36 ± 0.08	0.42 ± 0.10	0.23 ± 0.03	0.29 ± 0.04
<i>elovl2</i>	0.09 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.10 ± 0.03	0.22 ± 0.07^	0.15 ± 0.03	0.24 ± 0.05
<i>elovl5a</i>	0.13 ± 0.04	0.15 ± 0.04	0.15 ± 0.04	0.16 ± 0.06	0.13 ± 0.03	0.12 ± 0.02

Примечание. \* – различия достоверны ( $p \leq 0.05$ ) по сравнению с рыбами из группы “24LD+КК”; ^ – различия достоверны ( $p \leq 0.05$ ) по сравнению с пестрятками из соответствующей группы.

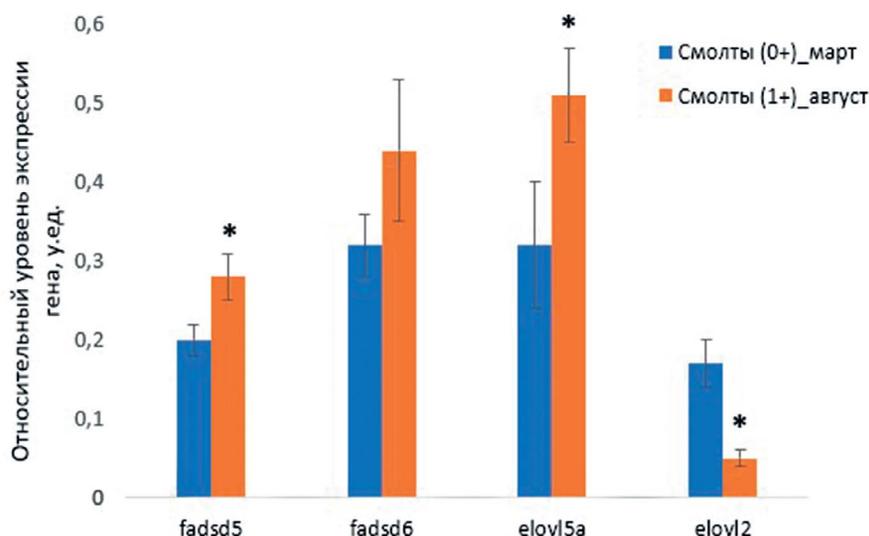


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии генов (у. ед.) *fadsd5*, *fadsd6*, *elovl2*, *elovl5a* в печени смолтов (0+, 1+) атлантического лосося в марте и августе.

\* – различия достоверны ( $p < 0.05$ ) по сравнению со смолтами в марте.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Пресноводные рыбы и диадромные из сем. Лососевые, в том числе атлантический лосось, способные к биосинтезу длинноцепочечных ПНЖК, должны проявлять всю ферментативную активность, необходимую для этого процесса (Morais *et al.*, 2009; Tocher, 2010; Monroig *et al.*, 2011). Атлантический лосось выделяется среди других рыб наличием 4 копий гена *fads2*, кодирующего десатуразы, и их особой функционализацией, когда одна копия гена несет информацию о ферменте с  $\Delta 5$  десатуразной активностью, а другие кодируют информацию о десатуразе с  $\Delta 6$  активностью (Hastings *et al.*, 2004; Monroig *et al.*, 2022). Фермент десатураза  $\Delta 5$  важен на этапе биосинтеза ЭПК из 20:4(n-3) ЖК и арахидоновой кислоты 20:4(n-6) из 20:3(n-6), а  $\Delta 6$  десатураза способствует биосинтезу ПНЖК из 18:2(n-6) ЖК и из 18:3(n-3), а также длинноцепочечных 24С ЖК, являющихся предшественниками в биосинтезе ДГК по пути Шпрехера (Sprecher *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2021) (рис. 1). Ранее в рамках данного эксперимента у молоди *S. salar* был установлен высокий уровень ПНЖК n-3 семейства в структурных липидах – фосфолипидах (ФЛ) (более 30% суммы ЖК) и показано повышение содержания ПНЖК в составе запасных триацилглицеринов (ТАГ) в печени от пестряток к смолтам в марте, что указывает на биохимические изменения в организме рыбы на этапе подготовки к смолтификации (Khurtina *et al.*, 2024).

В настоящей работе установлено, что относительный уровень экспрессии гена *fadsd6*, кодирующего  $\Delta 6$  десатуразу, у *S. salar* был высоким

и оставался на относительно стабильном уровне как у пестряток, так и у смолтов, независимо от месяца исследования. Значение относительного уровня экспрессии гена *fadsd5*, кодирующего  $\Delta 5$  десатуразу, достоверно не различалось при сравнении пестряток и смолтов в марте. При этом следует отметить обнаруженные вариации значений у смолтов в марте: более низкий относительный уровень экспрессии *fadsd5* у рыб из группы “ЕстLD+КД” по сравнению с группой “24LD+КК”. Данные ЖК профиля (ФЛ и ТАГ) по содержанию ЭПК, которая образуется под действием  $\Delta 5$  десатуразы из 20:4(n-3) (рис. 1), не выявили достоверных различий у рыб этих групп. Однако количество ЭПК в ФЛ у смолтов лосося из группы “24LD+КК” было на 1% выше (24% суммы ЖК), чем у рыб из “ЕстLD+КД” (23%) (Khurtina *et al.*, 2024). В ТАГ содержание ЭПК было в 2 раза ниже, чем в ФЛ (менее 10%), и достоверно не различалось у рыб из данных групп (Khurtina *et al.*, 2024). Полученные результаты могут способствовать предпочтительному прикладному использованию режима “24LD+КК” при выращивании *S. salar* в аквакультуре, который, как ранее было установлено, также повышает темпы роста и развития его молоди.

Способность к биосинтезу длинноцепочечных ПНЖК у рыб варьирует и во многом зависит не только от набора генов ферментов десатураз, но также элонгаз (Elovl) (Morais *et al.*, 2009; Monroig *et al.*, 2022). Среди них именно элонгазы *Elovl2*, *Elovl4*, *Elovl5* задействованы в этом процессе (рис. 1) и наиболее изучены у коммерчески значимых рыб (Jakobsson *et al.*, 2006; Monroig *et al.*, 2011). Другие представители

семейства элонгаз *Elovl1*, *Elovl3*, *Elovl6*, *Elovl7* участвуют в синтезе насыщенных и мононенасыщенных ЖК, в том числе у рыб (Jakobsson *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2016). Ген элонгазы *Elovl8* был обнаружен у пресноводного африканского клариевого сома *Clarias gariepinus* (Oboh, 2018) и сига *Siganus canaliculatus* (Li *et al.*, 2020), на основе исследования которых было подтверждено участие этого фермента в биосинтезе ПНЖК. Сведения о его присутствии у *S. salar* пока отсутствуют (Monroig *et al.*, 2022). У атлантического лосося были определены и функционально охарактеризованы *Elovl2*, *Elovl4*, *Elovl5*, наличие которых совместно с десатуразами с активностью  $\Delta 5$  и  $\Delta 6$  объясняют способность *S. salar* биосинтезировать ДЦ-ПНЖК, включая ДГК (Morais *et al.*, 2009; Carmona-Antoñanzas *et al.*, 2011). В случае отсутствия одного из ключевых генов биосинтеза ПНЖК или низкого уровня его экспрессии рыба не может биосинтезировать эти ЖК, как, например, у колочеперых рыб при отсутствии *elovl2* (Morais *et al.*, 2009). Функциональная характеристика полипептидов, кодируемых генами *elovl2* и *elovl5*, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* показала, что *Elovl2* имеет большую по сравнению с *Elovl5* субстратную специфичность к ПНЖК с длиной цепи C20 и C22 и низкую по отношению к ПНЖК с длиной цепи C18 (Morais *et al.*, 2009). *Elovl4* играет важную роль в биосинтезе ЖК с 22 и более атомами углерода в цепи (Carmona-Antoñanzas *et al.* 2011).

В данной работе у смолтов лосося в марте относительный уровень экспрессии *elovl2* был выше по сравнению с пестрятками, что согласуется с данными ЖК анализа, а именно повышением от пестряток к смолтам содержания ДГК в составе ФЛ, тогда как в составе ТАГ повышается количество докозапентаеновой кислоты 22:5(n-3) (ДПК) у групп лосося с кормлением в светлое время суток (Khurtina *et al.*, 2024). Известно, что у костистых рыб ДПК образуется из ЭПК под действием элонгаз, в том числе *Elovl2* (рис. 1). Полученные результаты исследований могут указывать на биосинтез ДГК у *S. salar* в печени по пути Шпрехера и отражают запуск на молекулярно-генетическом уровне адаптивных изменений, связанных с биосинтезом и включением ПНЖК в отдельные липидные классы (ДГК – в ФЛ, а ДПК – в ТАГ) согласно их функциональному значению в клетке и в ответ на воздействие факторов окружающей среды при трансформации пестряток в смолтов.

Для атлантического лосося известно также влияние питания на экспрессию генов и активность ферментов биосинтеза ДЦ-ПНЖК (Morais *et al.*, 2009; Monroig *et al.*, 2011). Так, уровни *elovl5b* и особенно *elovl2*, но не *elovl5a*, были значительно повышены в печени лосося, которого кормили растительным маслом, по сравнению с рыбами, которых кормили рыбьим жиром (Morais *et al.*,

2009). Питание растительными кормами (по сравнению с кормами, богатыми ДГК и ЭПК) стимулирует экспрессию  $\Delta 6$  десатуразы в печени и кишечнике лосося (Zheng *et al.*, 2004, 2005a,b; Leaver *et al.*, 2008).

В данной работе показано, что относительный уровень экспрессии гена *elovl 4* в печени *S. salar* был низким у всех исследованных групп лосося. Известно, что *Elovl 4* играет важную роль в биосинтезе ДЦ-ПНЖК с  $\geq 24$  С в цепи, высокое содержание которых было показано в сетчатке глаз, мозге и семенниках у атлантического лосося (Carmona-Antoñanzas *et al.* 2011; Harkewicz *et al.*, 2012). Так, установленный низкий уровень относительной экспрессии *elovl4* в печени молоди *S. salar* отражает тканеспецифичность работы гена, а также указывает на значимую роль *Elovl2* на этапе образования 24:5(n-3) из 22:5(n-3) ЖК.

Снижение относительного уровня экспрессии *elovl2* и повышение *elovl5a* и *fadsd5*, установленное у смолтов лосося в августе, по сравнению со смолтами в марте может быть обусловлено влиянием изменившихся в июне условий содержания, а также быть связано с процессами роста и развития рыбы. В августе рыбы содержались при естественном освещении и кормлении в светлое время суток, так же как и в марте, но при этом средняя температура воды была значительно выше (16 °C vs 11 °C), что может выделять влияние этого фактора как одного из ведущих. В ряде работ показано влияние температуры на регуляцию экспрессии генов биосинтеза ПНЖК у молоди рыб (Tocher *et al.*, 2004; Norambuena *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2023). Известно, что на метаболизм арахидоновой 20:4(n-6) ЖК и ЭПК у молоди атлантического лосося в совокупности могут оказывать температура и поступление этих кислот при питании (Norambuena *et al.*, 2015).

Таким образом, значения экспрессии гена *fadsd6* десатуразы достоверно не различались между экспериментальными группами рыб. У смолтов *S. salar* в марте из группы “24LD+КК” (круглосуточное освещение и кормление) был установлен достоверно более высокий относительный уровень экспрессии *fadsd5* в сравнении с рыбами из группы “ЕстLD+КД” (естественное освещение и питание в светлое время суток), что может способствовать предпочтительному прикладному использованию “24LD+КК” в технологии выращивания молоди лосося в аквакультуре, при котором наблюдаются повышенные темпы роста рыбы.

Установленный достоверно более высокий уровень экспрессии гена фермента элонгазы *elovl2*, ключевого фермента на пути биосинтеза ДПК и далее ДГК по пути Шпрехера, у смолтов лосося в марте по сравнению с пестрятками соотносится с полученными в рамках этого же эксперимента данными ЖК состава ФЛ и ТАГ в печени молоди

атлантического лосося (в ФЛ у смолтов повышается содержание ДГК, а в ТАГ – ЭПК). Изменения в экспрессии исследованных генов (*elovl2*, *elovl5a* и *fadsd5*) у смолтов лосося в августе по сравнению с таковым в марте отражают адаптивные процессы в организме рыб на молекулярно-генетическом уровне в процессе роста и развития и в ответ на изменения условий окружающей среды.

Результаты исследования позволяют оценить способность/потребность молоди лосося к биосинтезу ПНЖК в процессе роста и развития.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа проведена в рамках проекта Российского научного фонда № 19-14-00081-П “Влияние физических факторов на эффективность искусственного (заводского) воспроизводства молоди атлантического лосося *Salmo salar*: физиолого-биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика”, а также государственного задания КарНЦ РАН FMEN-2022-0006.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

### ЭТИЧЕСКИЕ СТАНДАРТЫ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах были соблюдены. Эксперименты одобрены комиссией по биоэтике Института биологии КарНЦ РАН, заключение № 5 от 4 апреля 2024 г.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Власов В.А., Маслова Н.И., Пономарев С.В., Баканева Ю.М. Влияние света на рост и развитие рыб // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. 2013. № 2. С. 24–34.
- Мурзина С.А., Нефедова З.А., Руоколайнен Т.Р., Васильева О.Б., Немова Н.Н. Динамика содержания липидов в процессе раннего развития пресноводного лосося *Salmo salar* L. // Онтогенез. 2009. Т. 40. № 3. С. 208–214.
- Мурзина С.А., Провоторов Д.С., Воронин В.П., Кузнецова М.В., Курицин А.Е., Немова Н.Н. Показатели липидного обмена у сеголеток атлантического лосося *Salmo salar* в условиях аквакультуры в южном регионе РФ при разных режимах освещения

и кормления // Известия РАН. Серия Биологическая. 2023а. № 2. С. 134–148.

DOI: 10.31857/S1026347022700081

- Мурзина С.А., Провоторов Д.С., Воронин В.П., Манойлова Д.И., Курицин А.Е., Пеккоева С.Н., Немова Н.Н. Фосфолипидный состав сеголеток атлантического лосося *Salmo salar* в процессе роста и развития в аквакультуре: влияние разных режимов освещения и кормления // Доклады российской академии наук. Науки о жизни. 2023б. Т. 509. С. 181–185.

DOI: 10.31857/S2686738923700397

- Немова Н.Н., Нефедова З.А., Мурзина С.А., Веселов А.Е., Рунатти. П.О., Павлов Д.С. Влияние экологических условий обитания на динамику жирных кислот у молоди атлантического лосося (*Salmo salar* L.) // Экология. 2015. № 3. С. 206–211.

DOI: 10.7868/S0367059715030087

- Khurtina S.N., Murzina S.A., Provotorov D.S., Voronin V.P., Kuritsyn A.E., Nemova N.N. Fatty acid composition of phospholipids and triacylglycerols of juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* L: grown under different and feeding conditions in aquaculture conditions (North Ossetia – Alania) // Russian Journal of Developmental Biology. 2024 (в печати).

- Шульгина Н.С., Чурова М.В., Немова Н.Н. Влияние фотопериода на рост и развитие лососевых *Salmonidae* северных широт // Журнал общей биологии. 2021. Т. 82. №1. С. 68–80.

DOI: 10.31857/S0044459621010073

- Эколого-биохимический статус молоди атлантического лосося *Salmo salar* L. из некоторых рек бассейна Белого моря / Под общ. ред. Н.Н. Немовой. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2016. 204 с.

- Berrill I.K., Porter M.J., Smart A., Mitchell D., Bromage N.R. Photoperiodic effects on precocious maturation, growth and smoltification in Atlantic salmon, *Salmo salar* // Aquaculture. 2003. V. 222. № 1–4. P. 239–252.

DOI: 10.1016/S0044-8486(03)00125-X

- Berrill I.K., Smart A., Porter M.J., Bromage N.R. A decrease in photoperiod shortly after first feeding influences the development of Atlantic salmon (*Salmo salar*) // Aquaculture. 2006. V. 254. № 1–4. P. 625–636.

DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.10.036

- Björnsson B.T., Stefansson S.O., McCormick S.D. Environmental endocrinology of salmon smoltification // General and comparative endocrinology. 2011. V. 170. № 2. P. 290–298.

DOI: 10.1016/j.ygcen.2010.07.003

- Bláhová Z., Harvey T.N., Pšenička M., Mráz J. Assessment of fatty acid desaturase (Fads2) structure-function properties in fish in the context of environmental adaptations and as a target for genetic engineering // Biomolecules. 2020. V. 10. №2. P. 206.

DOI: 10.3390/biom10020206

- Carmona-Antoñanzas G., Monroig Ó., Dick J.R., Davie A., Tocher D.R.* Biosynthesis of very long-chain fatty acids (C > 24) in Atlantic salmon: Cloning, functional characterisation, and tissue distribution of an *Elovl4* elongase // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2011. V. 159. № 2. P. 122–129.  
DOI: 10.1016/j.cbpb.2011.02.007
- Castro L.F.C., Tocher D.R., Monroig O.* Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates: Insights into the evolution of Fads and *Elovl* gene repertoire // *Progress in lipid research*. 2016. V. 62. P. 25–40.  
DOI: 10.1016/j.plipres.2016.01.001
- Hansen T., Stefansson S., Taranger G.L.* Growth and sexual maturation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., reared in sea cages at two different light regimes // *Aquac. Fish. Manage.* 1992. V. 23. № 3. P. 275–280.  
DOI: 10.1111/j.1365-2109.1992.tb00770.x
- Hastings N., Agaba M.K., Tocher D.R., Zheng X., Dickson C.A., Dick J.R., Teale A.J.* Molecular cloning and functional characterization of fatty acyl desaturase and elongase cDNAs involved in the production of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from  $\alpha$ -linolenic acid in Atlantic salmon (*Salmo salar*) // *Marine Biotechnology*. 2004. V. 6. P. 463–474.  
<https://doi.org/10.1007/s10126-004-3002-8>
- Harkewicz R., Du H., Tong Z., Alkuraya H., Bedell M., Sun W., Wang X., Hsu Y.-H., Esteve-Rudd J., Hughes G., Su Z., Zhang M., Lopes V.S., Molday R.S., Williams D.S., Dennis E.A., Zhang K.* Essential role of *ELOVL4* protein in very long chain fatty acid synthesis and retinal function // *Journal of Biological Chemistry*. 2012. V. 287. № 14. P. 11469–11480.  
DOI: 10.1074/jbc.M111.256073
- Imstrand A.K.D., Roth B., Fjelldal P.G., Stefansson S.O., Handeland S., Mikalsen B.* The effect of continuous light at low temperatures on growth in Atlantic salmon reared in commercial size sea pens // *Aquaculture*. 2017. V. 479. P. 645–651.  
DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.07.014
- Guillou H., Zdravec D., Martin P.G., Jacobsson A.* The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice // *Progress in lipid research*. 2010. V. 49. № 2. P. 186–199.  
DOI: 10.1016/j.plipres.2009.12.002
- Jakobsson A., Westerberg R., Jacobsson A.* Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism // *Prog. Lipid Res.* 2006. V. 45. P. 237–249.  
DOI: 10.1016/j.plipres.2006.01.004
- Leaver M.J., Villeneuve L.A.N., Obach A., Jensen L., Bron J.E., Tocher D.R., Taggart J.B.* Functional genomics reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*) // *BMC Genomics*. 2008. V. 9. P. 299.  
DOI: 10.1186/1471-2164-9-299
- Leclercq E., Taylor J.F., Sprague M., Migaud H.* The potential of alternative lighting-systems to suppress preharvest sexual maturation of 1+ Atlantic salmon (*Salmo salar*) post-smolts reared in commercial sea-cages // *Aquac. Eng.* 2011. V. 44. № 2. P. 35–47.  
DOI: 10.1016/j.aquaeng.2010.12.001
- Li Y., Wen Z., You C., Xie Z., Tocher D.R., Zhang Y., Wang S., Li Y.* Genome wide identification and functional characterization of two LC-PUFA biosynthesis elongase (*elovl8*) genes in rabbitfish (*Siganus canaliculatus*) // *Aquaculture*. 2020. V. 522. 735127.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735127>
- Livak K.J., Schmittgen T.D.* Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method // *Methods*. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408.  
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Miao L.H., Remø S.C., Espe M., Philip A.J.P., Hamre K., Fjelldal P.G., Skjærven K., Holen E., Vikeså V., Sissener N.H.* Dietary plant oil supplemented with arachidonic acid and eicosapentaenoic acid affects the fatty acid composition and eicosanoid metabolism of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during smoltification // *Fish & Shellfish Immunology*. 2022. V. 123. P. 194–206.  
DOI: 10.1016/j.fsi.2022.02.049
- Monroig Ó., Shu-Chien A.C., Kabeya N., Tocher D.R., Castro L.F.C.* Desaturases and elongases involved in long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic animals: From genes to functions // *Progress in Lipid Research*. 2022. V. 86. Article ID101157.  
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101157>
- Monroig Ó., Zheng X., Morais S., Leaver M.J., Taggart J.B., Tocher D.R.* Multiple genes for functional  $\Delta 6$  fatty acyl desaturases (Fad) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Gene and cDNA characterization, functional expression, tissue distribution and nutritional regulation // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. V. 180. P. 1072–1081.  
DOI: 10.1016/j.bbali.2010.04.007
- Monroig O., Navarro C., Tocher D.R.* Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Fish: Recent Advances on Desaturases and Elongases Involved in Their Biosynthesis. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), *Avances en Nutrición Acuícola XI –Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, 23–25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, 2011. pp. 257–283.
- Morais S., Monroig Ó., Zheng X., Leaver M.J., Tocher D.R.* Highly unsaturated fatty acid synthesis in Atlantic salmon: characterization of *Elovl5*- and *Elovl2*-like elongases // *Mar. Biotechnol.* 2009. V. 11. P. 627–639.  
DOI: 10.1007/s10126-009-9179-0
- Nemova N.N., Murzina S.A., Lysenko L.A., Meshcheryakova O.V., Churova M.V., Kantserova N.P., Nefedova Z.A.,*

- Krupnova M.Yu., Pekkoeva S.N., Ruokolainen T.R., Veselov A.E., Efremov D.A.* Ecological and biochemical status of the Atlantic salmon *Salmo salar* L. and the brown trout *Salmo trutta* L. at early stages of development // *Biology bulletin reviews*. 2020. V. 10. P. 239–249.
- Noori A., Mojazi Amiri B., Mirvaghefi A., Rafiee G., Kalvani Neitali B.* Enhanced growth and retarded gonadal development of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) following a long-day photoperiod // *Aquac. Res.* 2015. V. 46. № 10. P. 2398–2406. DOI: 10.1111/are.12398
- Norambuena F., Morais S., Emery J.A., Turchini G.M.* Arachidonic acid and eicosapentaenoic acid metabolism in juvenile Atlantic salmon as affected by water temperature // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 11. e0143622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143622>
- Oboh A.* Investigating the long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). PhD Thesis. University of Stirling, 2018.
- Ren H.T., Gao S.Y., Huang Y., Gao X.C.* Temperature regulates fatty acid desaturase and elongase at the transcriptional level and modulates the fatty acid profile in the early stage of the common carp (*Cyprinus carpio*) // *Czech J. Anim. Sci.* 2023. V. 68. P. 313–321. DOI: 10.17221/22/2023-CJAS
- Sprecher H.* Metabolism of highly unsaturated *n*-3 and *n*-6 fatty acids // *Biochim Biophys Acta*. 2000. V. 1486. P. 219–231. DOI: 10.1016/s1388-1981(00)00077-9
- Tocher D.R.* Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish // *Rev Fisheries Sci.* 2003. V. 11. P. 107–184. DOI: 10.1080/713610925
- Tocher D.R., Fonseca-Madrigal J., Dick J.R.* Effects of water temperature and diet containing palm oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Comp Biochem Physiol B*. 2004. V. 137. №1. P. 49–63. DOI: 10.1016/j.cbpc.2003.10.002
- Tocher D.R.* Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish // *Aquaculture research*. 2010. V. 41. № 5. P. 717–732. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02150.x>
- Vestergren A.S.* Regulation of Genes related to Lipid Metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) // *Vitro and In Vivo Studies*. Licentiate Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, 2012.
- Vestergren A.S., Trattner S., Mráz J., Ruyter B., Pickova J.* Fatty acids and gene expression responses to bioactive compounds in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) hepatocytes // *Neuro Endocrinol Lett.* 2011. V. 32 (Suppl 2). P. 41–50.
- Villarreal C.A., Thorp J.E., Miles M.S.* Influence of photoperiod on growth changes in juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* L. // *Journal of Fish Biology*. 1988. V. 33. №1. P. 15–30. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1988.tb05445.x
- Xie D., Chen C., Dong Y., You C., Wang S., Monroig Ó., Tocher D.R., Li Y.* Regulation of long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in teleost fish // *Progress in Lipid Research*. 2021. V. 82, 101095. DOI: 10.1016/j.plipres.2021.101095
- Zheng X., Tocher D.R., Dickson C.A., Bell J.G., Teale A.J.* Effects of diets containing vegetable oil on expression of genes involved in highly unsaturated fatty acid biosynthesis in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) // *Aquaculture* 2004. V. 236. P. 467–483. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2004.02.003
- Zheng X., Tocher D.R., Dickson C.A., Dick J.R., Bell J.G., Teale A.J.* Highly unsaturated fatty acid synthesis in vertebrates: new insights with the cloning and characterisation of a  $\Delta 6$  desaturase of Atlantic salmon // *Lipids*. 2005a. V. 40. P. 13–24. DOI: 10.1007/s11745-005-1355-7
- Zheng X., Torstensen B.E., Tocher D.R., Dick J.R., Henderson R.J., Bell J.G.* Environmental and dietary influences on highly unsaturated fatty acid biosynthesis and expression of fatty acyl desaturases and elongase genes in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) // *Biochim Biophys Acta*. 2005b. V. 1734. P. 13–24. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2005.01.006

**Influence of different lighting and feeding regimes  
on the expression of the *fadsd5*, *fadsd6*, *elovl2*, *elovl5a* desaturase  
and elongase genes in the liver of juvenile Atlantic Salmon *Salmo salar* L.  
under aquaculture conditions**

**S. N. Khurtina<sup>#</sup>, S. A. Murzina, M. V. Kuznetsova, N. N. Nemova**

*Environmental Biochemistry Laboratory, Institute of Biology of the Karelian Research Centre  
of the Russian Academy of Sciences, st. Pushkinskaya, 11, Petrozavodsk, 185910 Russia*

*<sup>#</sup>E-mail: pek-svetlana@mail.ru*

The relative gene expression of enzymes – desaturases and elongases (*fadsd5*, *fadsd6*, *elovl2*, *elovl5a*, *elovl4*), which play a key role in the biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids, was studied in the liver of juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* Linnaeus, 1758, reared under different lighting and feeding regimes in aquaculture conditions. The expression level of the *fadsd5* desaturase gene was higher in Atlantic salmon smolts (0+), reared under round-the-clock lighting and feeding regime, compared to smolts from experimental group with natural photoperiod and daylight feeding. Changes in the level of gene expression (*elovl2*, *elovl5a*, *fadsd5*) in juvenile *Salmo salar* reflect adaptive processes at the molecular genetic level during the growth and development of fish and in response to changes in environmental conditions. The obtained results make it possible to assess the ability/requirement to the biosynthesis of PUFAs in juvenile salmon during its growth and development.

*Keywords:* Atlantic salmon, gene expression, desaturases, elongases, fatty acids, smoltification, early development, aquaculture

УДК 577:[597.552.512: 639.3.043.2]

## АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА У СЕГОЛЕТОК РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ (*ONCORHYNCHUS MYKISS* WALB.) ПРИ КОРМЛЕНИИ ДВУМЯ ВИДАМИ КОММЕРЧЕСКИХ КОРМОВ

© 2024 г. М. А. Родин, М. В. Кузнецова, М. Ю. Крупнова, А. Е. Курицын, С. А. Мурзина, Н. Н. Немова

Институт биологии – обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр РАН», ул. Пушкинская 11, Петрозаводск, 185910 Россия,  
@E-mail: mikhail.rodin.mr@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.06.2024 г.

После доработки 28.06.2024 г.

Принята к публикации 28.06.2024 г.

Исследовали активность ферментов энергетического и углеводного обмена (цитохром с оксидазы, лактатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 1-глицерофосфатдегидрогеназы, пируваткиназы, альдолазы) в мышцах и печени радужной форели *Oncorhynchus mykiss* Walb. трех размерных групп (РГ) возрастом 5, 10 и 12 месяцев при влиянии двух видов коммерческих кормов с различающимся составом. Уровни активности ферментов Г6ФДГ, 1-ГФДГ и альдолазы в печени были достоверно выше у рыб из группы «Корм №2». Выявленные различия в активности ферментов в печени рыб позволяют предположить, что корм №2 в большей степени (по сравнению с кормом №1) способствует использованию углеводов в биосинтезе липидов. Различия в активности ферментов ЦО, ЛДГ, альдолазы, Г6ФДГ и 1-ГФДГ в печени и мышцах рыб в зависимости от месяца сбора проб и принадлежности к размерной группе связаны, вероятнее всего, с перестройками в метаболизме рыб по мере увеличения массы в сторону генеративного обмена.

**Ключевые слова:** радужная форель, энергетический обмен, активность ферментов, состав корма  
**DOI:** 10.31857/S1026347024060038, **EDN:** ukxmgf

Наиболее важной характеристикой организма рыб, которая определяет состояние отдельной особи и популяции в целом (как в естественной среде, так и в аквакультуре), является их рост. Для оценки темпов роста используют линейно-весовые показатели, но для понимания механизмов влияния внешних факторов важно оценить пути регуляции роста на уровне метаболизма и распределение энергетических ресурсов между жизненно важными процессами в организме рыб. Важнейшим метаболическим фактором, определяющим процессы роста и развития рыб, является уровень энергетического обмена. Достаточный уровень образования АТФ определяет активный рост и развитие организма рыб, особенно в период раннего онтогенеза и в первые годы жизни, когда требуются большие энергетические затраты на синтез структурных, функциональных и запасных соединений (Озернюк, 1985). В качестве индикаторов интенсивности биохимических процессов в клетке, связанных с аэробным и анаэробным

генерированием энергии, а также синтезом различных промежуточных соединений, выступают ключевые ферменты энергетического и углеводного метаболизма. Основываясь на анализе их активности, можно судить о функционировании органов рыб и особенностях метаболизма, обеспечивающих рост и адаптацию к различным факторам среды (Somero, Childress, 1980; Gauthier *et al.*, 2008; Чурова и др., 2015).

Важным фактором, который влияет на уровень энергетического обмена (перераспределение энергетических субстратов), является состав пищи, соотношение белков, жиров и углеводов в ней (Talukdar *et al.*, 2019). Белок является наиболее предпочтительным питательным веществом в рационе рыб, поскольку служит главным строительным материалом для мышечных тканей. Липиды играют важную роль в энергетическом и пластическом обмене, служат предшественниками стероидных гормонов и эйкозаноидов. Достаточный уровень углеводов в составе корма снижает катаболизм

белка в энергетическом обмене и способствует использованию белка пищи в биосинтезе, обеспечивая тем самым увеличение мышечного роста. На примере радужной форели было показано, что отсутствие углеводов усиливает распад и снижает скорость синтеза белка в белых мышцах (Pegagon, 1999). В этом случае важная часть аминокислот, высвобождаемая в результате переваривания пищевых белков и распада мышечных белков, будет использоваться для целей глюконеогенеза, а не для синтеза белка и роста. Из-за ограниченного доступа к углеводам в природе пищеварительная система рыб приспособилась к использованию белков и липидов в качестве главного источника энергии. При этом степень использования углеводов у разных видов различается и зависит от источника углеводов и их состава, влияющих на чувствительность к ферментативным реакциям для полного переваривания (Yengkokram *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2010). Поскольку рыба обычно потребляет мало углеводов, их избыток может привести к стрессу и подавлению иммунитета (Small, Soares, 1999), поэтому уровень углеводов в рационе должен находиться в пределах нормы. На примере плотоядной рыбы дорады (*Sparus aurata*) показано, что питание высокоуглеводной диетой с низким содержанием белка стимулирует в печени активность ключевых ферментов гликолиза и пентозофосфатного пути, что способствует использованию высокоуглеводной диеты и экономии белка (Meton *et al.*, 1999).

Выбор качественного сбалансированного корма является одной из важных задач в аквакультуре. При выборе корма с целью достижения максимального роста искусственно выращиваемых рыб необходимо понимание влияния состава корма (применяемых источников основных нутриентов) на метаболические пути в органах рыб. Цель данного исследования – проанализировать активность ферментов энергетического и углеводного обмена (цитохром *c* оксидазы, лактатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 1-глицерофосфатдегидрогеназы, пируваткиназы и альдолазы) в мышцах и печени особей радужной форели *Oncorhynchus mykiss* Walb., выращиваемых с использованием двух видов коммерческих кормов с различающимся составом. Дополнительно были поставлены следующие задачи: изучить активность ферментов в органах рыб в зависимости от времени суток после кормления, месяца исследования и размеров рыб.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на радужной форели, выращиваемой на предприятии в Северной Осетии – Алании. Данный регион обладает характерными

экологическими особенностями, отличающими его от северных регионов. Температура питающих бассейнов подземных вод меняется в узком диапазоне (8°–18°C) без выраженного зимнего периода, позволяя рыбе питаться и расти круглый год. Также следует отметить высокие температуры воздуха летом, световой режим без периода «белых ночей», относительно высокие показатели pH, минерализации воды и степени насыщения кислородом. Исследовали молодь форели из трех размерных групп (РГ) возрастом 5, 10 и 12 месяцев, со средней массой на начало эксперимента  $192.2 \pm 11.8$ ,  $425.5 \pm 23.7$  и  $1380.1 \pm 31.0$  г соответственно. Эксперимент длился два месяца с августа по октябрь. В этот период кормление проводили 4 раза в день, используя два вида коммерческих кормов разных производителей (корм №1 и №2). Согласно составу, заявленному производителями, соотношение сырых протеина–жира–клетчатки в кормах №1 и №2 составило (40–43)–(24–27)–(1–2.9) % и 45–25–2.8 % соответственно. В составе используемых кормов из общих ингредиентов указаны рыбная мука, рыбий жир, рапсовое масло, соевый жмых, пшеница, гемоглобиновая мука и бобовые (для корма №1 расписанные как гуаровая белковая мука, горох, кормовые бобы). Помимо этого, в корм №1 входит кровяная мука, в корм №2 – птичий жир, кукурузный глютен, льняное масло и гидролизованная перьевая мука. Оба корма содержат витаминно-минеральный премикс (для корма №1 указаны витамины А, D3 и Е, для корма №2 – Е). До начала эксперимента рыбы питались кормом №2. Пробы для анализа собирали через 30 мин и через 24 ч после последнего кормления на 30 и 60 день эксперимента. Линейно-весовые характеристики рыб, взятых для анализа, представлены в таблице 1.

Активность ферментов определяли в пробах мышц и печени методом спектрофотометрии (CLARIOSTAR, BMG Labtech). В мышцах определяли активность цитохром *c* оксидазы (ЦО, КФ 1.9.3.1), лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ 1.1.1.27), пируваткиназы (ПК, КФ 2.7.1.40) и альдолазы (КФ 4.1.2.13), в печени – активность ЦО, ЛДГ, ПК, альдолазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49) и 1-глицерофосфатдегидрогеназы (1-ГФДГ, КФ 1.1.1.8). Образцы тканей гомогенизировали в 0.05 М TrisHCl-буфере (pH = 7.5). Активность ЦО определяли по увеличению окисленного цитохрома *c* (Smith, 1955). Активность ЛДГ, Г6ФДГ и 1-ГФДГ определяли по общепринятым методикам, измеряя количества восстановленных НАД и НАДФ (Кочетов, 1980). Активность ПК определяли по количеству образовавшегося НАД в системе, содержащей НАДН и ЛДГ (Bücher, 1955). Активность альдолазы измеряли колориметрическим методом, определяющим динитрофенилгидразоны свободных триоз (Колб, Камышников, 1976). Активность ферментов выражали

**Таблица 1.** Линейно-весовые характеристики рыб, взятых для анализа

Размерная группа (РГ)	Группа	30 дней		60 дней	
		30 мин	24 ч	30 мин	24 ч
Масса, г					
РГ1	Корм 1	282.0 ± 6.7	307.0 ± 10.8	480.8 ± 16.5	423.6 ± 9.1
	Корм 2	249.1 ± 10.1	252.0 ± 16.7	402.8 ± 12.6	483.6 ± 31.0
РГ2	Корм 1	677.4 ± 30.2	650.1 ± 46.1	928.9 ± 40.8	981.8 ± 11.2
	Корм 2	622.2 ± 12.4	648.3 ± 38.8	927.0 ± 29.3	988.5 ± 54.7
РГ3	Корм 1	1724.8 ± 23.4	1656.7 ± 30.2	2105.5 ± 44.2	2239.1 ± 48.9
	Корм 2	1756.0 ± 11.5	1563.1 ± 34.5	2405.7 ± 36.4	2292.5 ± 63.4
Длина, см					
РГ1	Корм 1	27.2 ± 4.1	27.8 ± 2.5	30.9 ± 2.9	30.6 ± 2.9
	Корм 2	26.0 ± 3.5	25.8 ± 4.4	30.4 ± 3.3	31.8 ± 3.4
РГ2	Корм 1	38.4 ± 4.7	37.2 ± 4.8	40.6 ± 4.7	41.4 ± 4.1
	Корм 2	36.4 ± 3.3	36.6 ± 4.1	39.4 ± 2.9	40.6 ± 3.9
РГ3	Корм 1	48.6 ± 3.6	48.8 ± 7.5	52.0 ± 2.7	52.8 ± 4.1
	Корм 2	49.2 ± 4.1	46.4 ± 2.6	52.4 ± 3.5	52.0 ± 2.7

в мкмоль/мин/мг белка. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976).

Статистический анализ полученных результатов проводили общепринятыми методами вариационной статистики. Данные были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро–Уилкса. Применен многофакторный дисперсионный анализ MANOVA для оценки степени влияния факторов (вид корма, размерная группа, время и дата сбора проб) на активность исследуемых ферментов. Для сравнения средних значений в выборках по исследуемым показателям применяли тест Краскела–Уоллиса, после чего выборки сравнивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались значимыми при  $p < 0.05$ . Все данные представлены как  $M \pm SE$ .

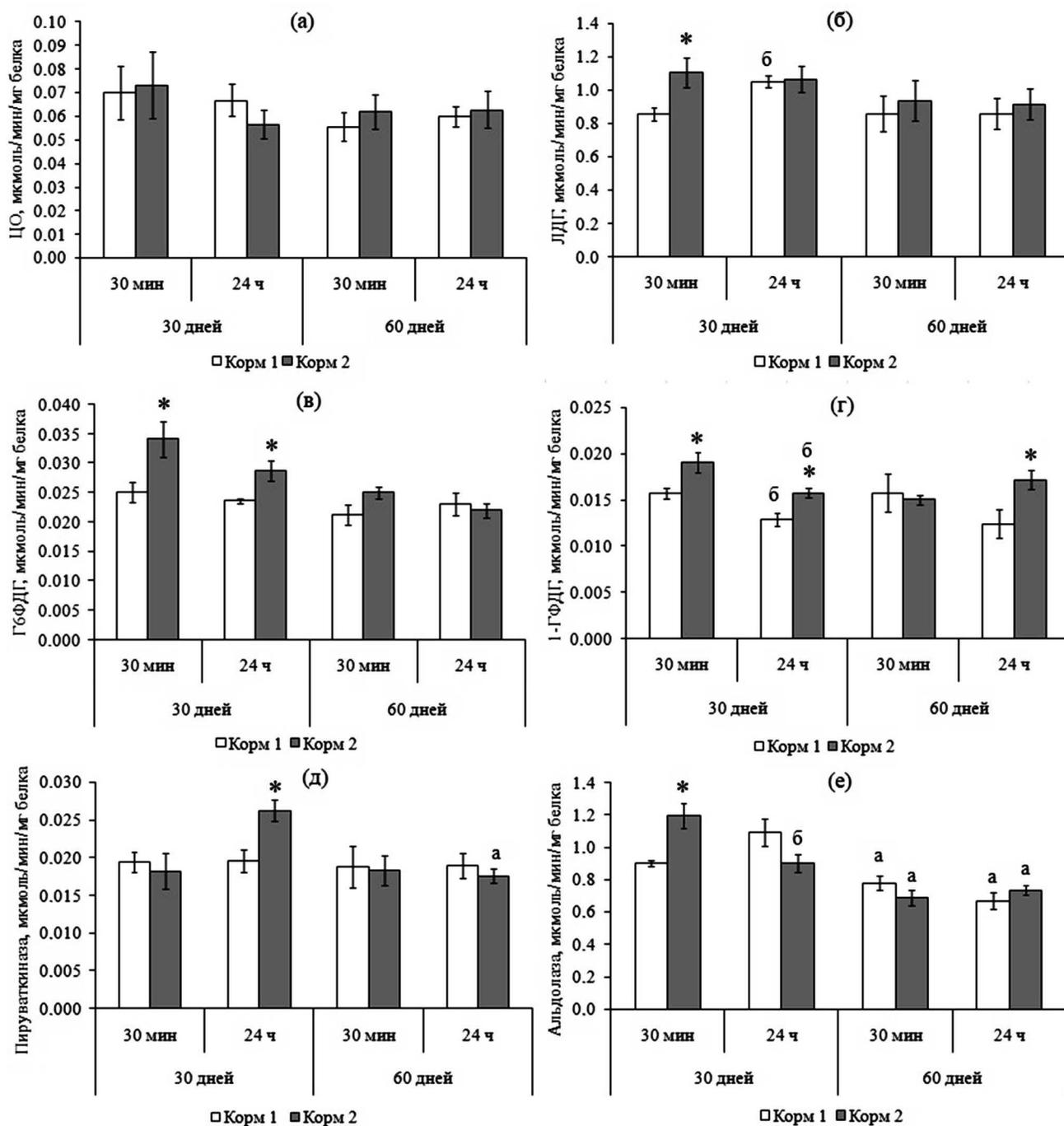
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Активность ферментов в печени*

**Межгрупповые различия.** Выявлены различия в активности ферментов в печени особой форели между группами, различающимися по используемому корму (рис. 1–3). Для разных размерных групп эти отличия имели свои особенности.

Для размерной группы 1 были установлены различия в активности ферментов ЛДГ, Г6ФДГ, 1-ГФДГ, пируваткиназы, альдолазы уже через 30 дней исследования (рис. 1). При этом активность Г6ФДГ, 1-ГФДГ была выше у рыб из группы «Корм №2» как через 30 минут после кормления, так и через сутки ( $p < 0.05$ , рис. 1 в, г). Активность ЛДГ, альдолазы и пируваткиназы также была выше в группе «Корм №2», при этом различия по ЛДГ

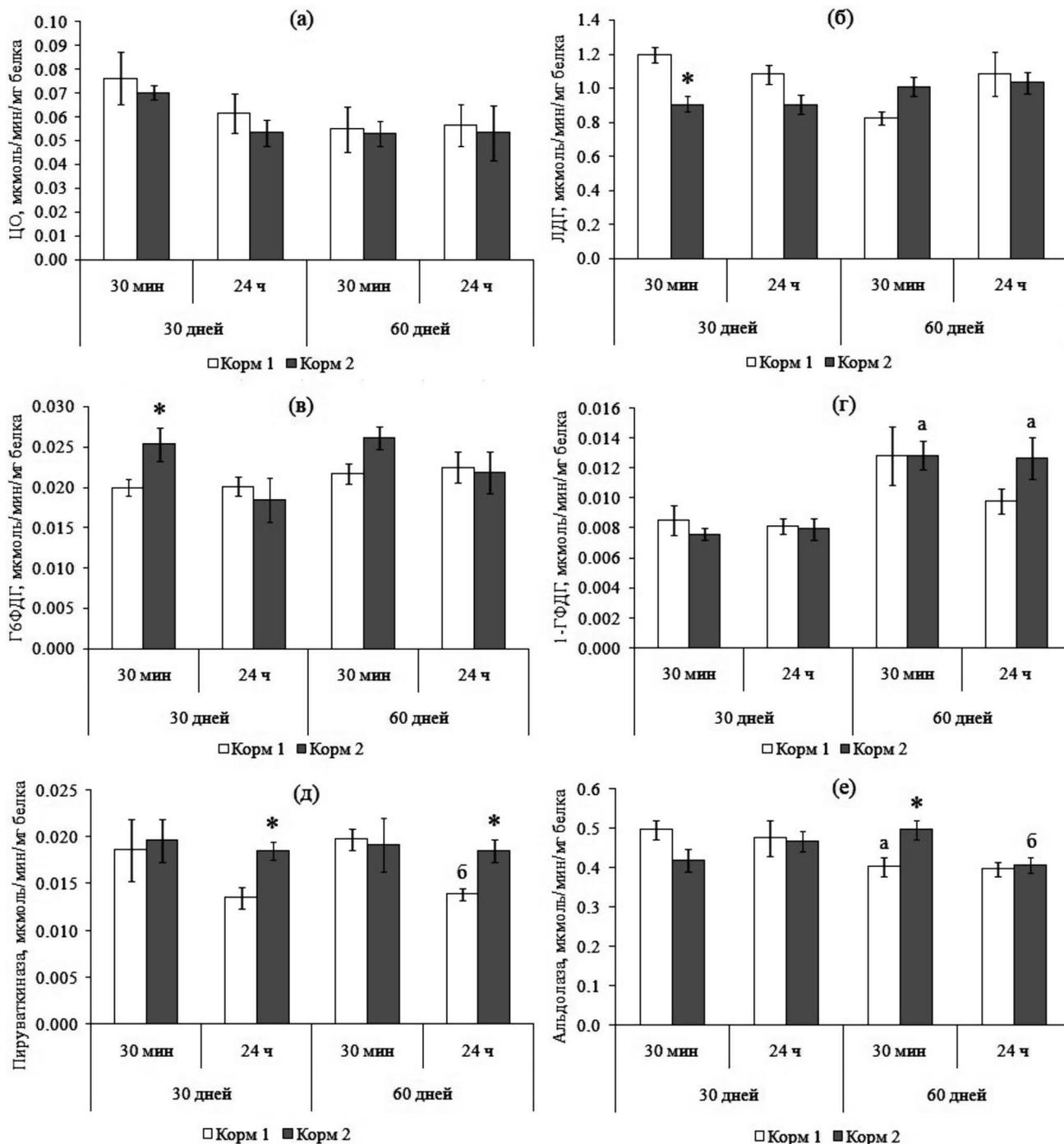
и альдолазе были зафиксированы через 30 минут после кормления ( $p < 0.05$ , рис. 1б, е), а для пируваткиназы – через сутки ( $p < 0.05$ , рис. 1д). Достоверных различий в активности ЦО не было выявлено (рис. 1а). Через 60 дней эксперимента активность 1-ГФДГ была выше у рыб в группе «Корм №2» через сутки после кормления ( $p < 0.05$ , рис. 1г), а активность Г6ФДГ имела тенденцию к повышенным значениям у рыб из этой группы (рис. 1в). Ферменты Г6ФДГ и 1-ГФДГ играют немаловажную роль в метаболических процессах рыб. Активность данных ферментов отражает связь углеводного обмена с обменом липидов. Г6ФДГ является ключевым ферментом пентозофосфатного пути (ПФП). В ходе данного процесса происходит образование пентоз и генерируется НАДФН – восстановитель, необходимый для реакций биосинтеза липидов (Tian *et al.*, 1998). Различия в активности Г6ФДГ могут свидетельствовать об усиленном синтезе эквивалентов НАДФН в группе «Корм №2», использующихся в дальнейших путях биосинтеза, в особенности в липогенезе (Meton *et al.*, 1999, Gauthier *et al.*, 2008). В исследовании Talukdar с соавт. (2019) было показано, что посредством изменения уровня углеводов в корме можно оказывать влияние на миогенез и липогенез. Так, при использовании желатинизированного крахмала в составе корма на уровне 35% наблюдались высокие темпы роста у *Clarias batrachus* и увеличивался уровень экспрессии ответственных за рост скелетных мышц генов (*MyoD* и *Myf5*). В этом же исследовании содержание крахмала в корме в количестве 45% приводило к снижению темпов роста мышц и повышению уровня синтеза липидов. При этом было показано, что активность Г6ФДГ положительно коррелирует с количественным содержанием углеводов в пище (Talukdar *et al.*, 2019).



**Рис. 1.** Активность ферментов: (а) ЦО, (б) ЛДГ, (в) Г6ФДГ, (г) 1-ГФДГ, (д) ПК, (е) альдолазы ( $\mu\text{кмоль}/\text{мин}/\text{мг}$  белка) в печени особей форели из РГ1, питавшихся разными кормами. \* – различия между группами «Корм №1» и «Корм №2» достоверны, а – различия между месяцами (30 дней и 60 дней) в соответствующей группе достоверны, б – различия по времени суток в соответствующей группе достоверны,  $p < 0.05$ .

В других исследованиях также было показано, что у радужной форели, дорады и некоторых других видов рыб активность этого фермента растет с увеличением количества углеводов в корме, снижается при голодании и коррелирует с размером

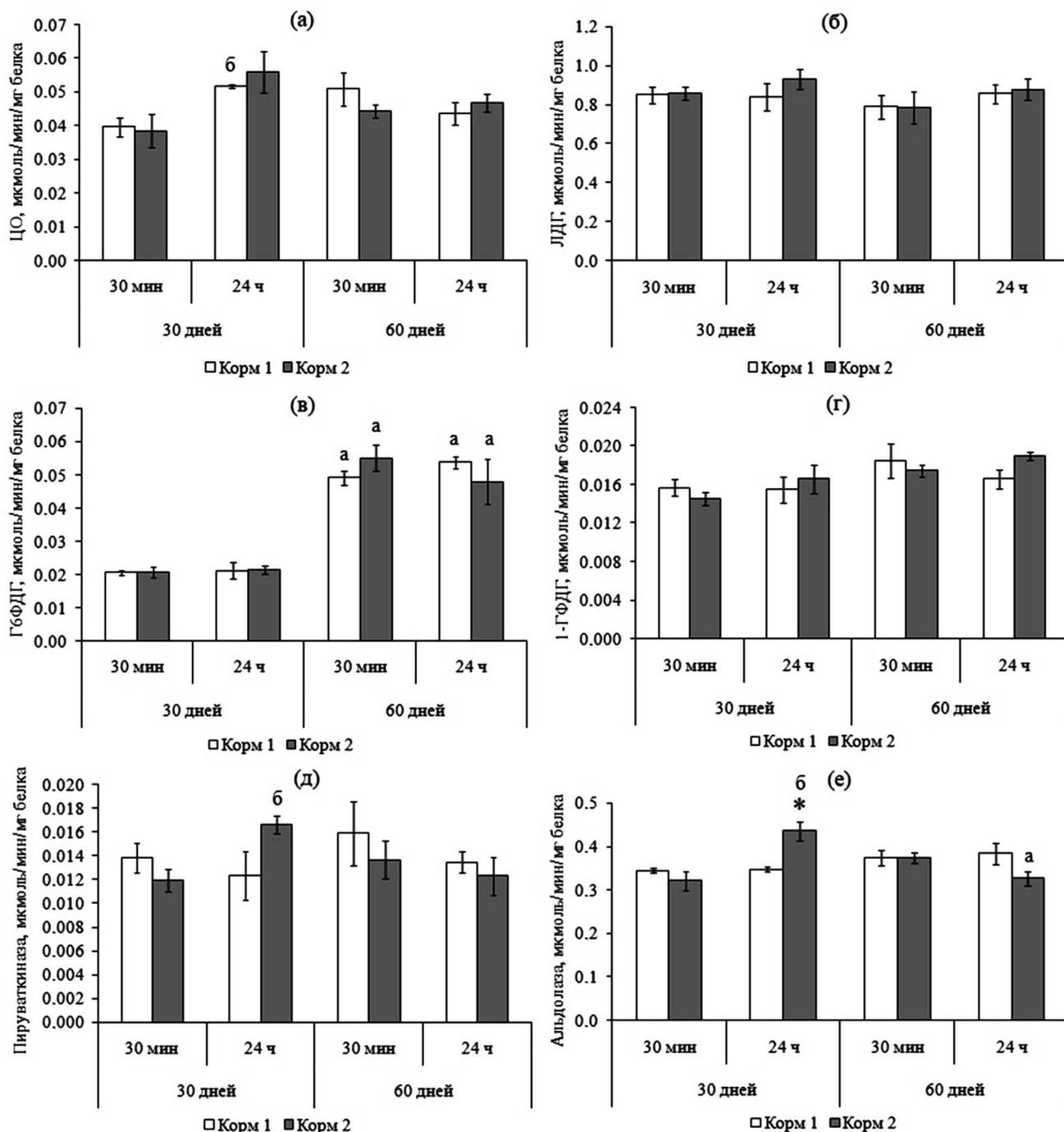
рациона (Bastrop *et al.*, 1992; Barroso *et al.*, 1993; Meton *et al.*, 1999). Фермент 1-ГФДГ является катализатором реакции, в ходе которой образуется предшественник структурных и запасных липидов – 1-глицерофосфат (Harmon, Sheridan, 1992;



**Рис. 2.** Активность ферментов: (а) ЦО, (б) ЛДГ, (в) Г6ФДГ, (г) 1-ГФДГ, (д) ПК, (е) альдолазы (мкмоль/мин/мг белка) в печени особей форели из РГ2, питавшихся разными кормами. \* – различия между группами «Корм №1» и «Корм №2» достоверны, а – различия между месяцами (30 дней и 60 дней) в соответствующей группе достоверны, б – различия по времени суток в соответствующей группе достоверны,  $p < 0.05$ .

Treberg *et al.*, 2002). Высокая активность этого фермента в печени рыб при использовании корма №2, вероятно, указывает на высокий уровень использования продуктов распада углеводов в липидном обмене. Таким образом, высокий

уровень активности Г6ФДГ и 1-ГФДГ у рыб, питавшихся кормом №2, характеризует более интенсивное использование углеводов в этой группе и направленность их применения в процессах биосинтеза липидов.



**Рис. 3.** Активность ферментов: (а) ЦО, (б) ЛДГ, (в) Г6ФДГ, (г) 1-ГФДГ, (д) ПК, (е) альдозаза (мкмоль/мин/мг белка) в печени особей форели из РГЗ, питавшихся разными кормами. \* – различия между группами «Корм №1» и «Корм №2» достоверны, а – различия между месяцами (30 дней и 60 дней) в соответствующей группе достоверны, б – различия по времени суток в соответствующей группе достоверны,  $p < 0.05$ .

Аэробный синтез АТФ является важнейшим процессом образования энергии, обуславливая активный рост организма, особенно на ранних стадиях развития. ЦО является ключевым ферментом дыхательной цепи митохондрий, характеризующим

интенсивность аэробного метаболизма (Gauthier *et al.*, 2008). Согласно результатам, различий в активности ЦО в печени а, следовательно, и в уровне аэробного синтеза АТФ, между группами «Корм №1» и «Корм №2» не установлено (рис. 1а).

Пируваткиназа – фермент гликолиза, катализирующий реакцию превращения фосфоенолпирувата в пируват. Активность пируваткиназы может использоваться как индикатор интенсивности образования пирувата, который используется в аэробном синтезе АТФ, а также в качестве предшественника для синтеза жирных кислот (Meton *et al.*, 1999). Согласно результатам, активность пируваткиназы аналогично уровням Г6ФДГ и 1-ГФДГ была выше в группе «Корм №2» ( $p < 0.05$ , рис. 1д). При этом отсутствие различий в уровне активности ЦО позволяет предположить, что более высокая интенсивность образования пирувата у рыб, питавшихся кормом №2, может быть связана с повышением синтеза липидов по сравнению с рыбами из группы «Корм №1».

ЛДГ – ключевой фермент анаэробного гликолиза, катализирующий взаимопревращение пирувата в лактат (Somero, Childress, 1980). Альдолаза – фермент, катализирующий четвертую обратимую реакцию гликолиза с образованием дигидроксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата, участвующих в дальнейших метаболических реакциях (Llewellyn, 1998). В печени активность ферментов ЛДГ и альдолазы преимущественно характеризует уровень глюконеогенеза (ресинтеза глюкозы из неуглеводных фрагментов) (Llewellyn, 1998; Konradt, Braunbeck, 2001; Johansen, Overturf, 2006; Enyu, Shu-Chien, 2011). Согласно полученным данным, значения активности ЛДГ и альдолазы могут указывать на более высокий уровень протекания глюконеогенеза в печени у рыб из группы «Корм №2» через 30 минут после последнего кормления на 30 день исследования ( $p < 0.05$ , рис. 1б, е). Выявленные различия в активности этих ферментов на следующие сутки не сохранялись.

В печени рыб из размерной группы 2 через 30 дней исследования были установлены различия в активности ЛДГ, Г6ФДГ, пируваткиназы (рис. 2). Активность ЛДГ была выше у форели в группе «Корм №1» через 30 минут после кормления ( $p < 0.05$ , рис. 2б). Активность ферментов Г6ФДГ и пируваткиназы была выше у рыб «Корм №2», при этом в случае Г6ФДГ различия были через 30 минут после кормления ( $p < 0.05$ , рис. 2в), а в случае пируваткиназы – через сутки ( $p < 0.05$ , рис. 2д). Через 60 дней эксперимента наблюдались различия в активности альдолазы и пируваткиназы. Значения активностей этих ферментов были выше в группе «Корм №2», при этом различия в активности альдолазы были выявлены через 30 минут после кормления ( $p < 0.05$ , рис. 2е), а различия в активности пируваткиназы – через сутки ( $p < 0.05$ , рис. 2д). Таким образом, для рыб из этой размерной группы, так же как и для особей из РГ1, различия между группами касались путей использования углеводов в последующем синтезе липидов, который был выше при применении корма №2.

Следует отметить, что основные межгрупповые различия были зафиксированы в РГ1 и РГ2. В РГ3 выявлены различия только в активности альдолазы, которая, как и в первых двух размерных группах, была выше у рыб, питавшихся кормом №2 ( $p < 0.05$ , рис. 3е). Других различий в РГ3 между группами по корму не было выявлено.

Таким образом, различия в активности ферментов печени могут указывать на то, что рыбы разных размерных групп (возраста) по-разному реагируют на исследуемые корма и содержащийся в них набор питательных веществ.

Динамика изменения активности ферментов. Что касается динамики изменения активности исследуемых ферментов в печени, стабильных различий, наблюдающихся и повторяющихся во всех размерных и экспериментальных группах и на протяжении двух месяцев исследования, между временем сбора проб через 30 мин и 24 ч после кормления установлено не было (рис. 1–3). При этом необходимо отметить, что разница в активности пируваткиназы между выборками особей из исследуемых групп «Корм №1» и «Корм №2», установленная для размерных групп РГ1 через месяц и РГ2 – в первый и во второй месяц, наблюдается на следующие сутки после кормления. Кроме того, изменения в активности ПК за сутки были разнонаправленными в экспериментальных группах, питающихся разными кормами. Так, на 30 день эксперимента через 24 часа после кормления у рыб, питающихся кормом №1, активность ПК либо не изменялась как в РГ1 и РГ3, либо уменьшалась как в РГ2 ( $p < 0.05$ , рис. 2д), а у рыб из группы «Корм №2» либо не изменялась как в РГ2, либо увеличивалась как в РГ3 ( $p < 0.05$  рис. 3д) и РГ1. Таким образом, в данных экспериментальных условиях для активности пируваткиназной реакции, вероятно, имеет значение период времени после последнего кормления рыб, а именно их суточное голодание.

Характер различий в уровне активности ферментов на протяжении эксперимента (между первым и вторым месяцем исследования) зависел от размеров рыб. У форели из РГ1 выявлены различия в активности альдолазы между месяцами отбора проб ( $p < 0.05$ , рис. 1е). Особи форели на 60 день эксперимента из обеих экспериментальных групп отличались более низким уровнем альдолазы, что, вероятно, указывает на снижение уровня использования углеводов и интенсивности глюконеогенеза (Llewellyn *et al.*, 1998). Показано, что на второй месяц эксперимента значения активности 1-ГФДГ у рыб в группе «Корм №2» из РГ2 выросли по сравнению с особями, отобранными в первый месяц исследования (рис. 2г). У рыб из РГ3 активность Г6ФДГ различалась в зависимости от месяца эксперимента (рис. 3в): установлен резкий скачок

активности этого фермента у форели на 60 день эксперимента, что, скорее всего, связано с возрастными особенностями рыб.

**Возрастные различия (различия между размерными группами).** Установлены различия в активности ферментов в печени особей форели разных размерных групп (РГ) (рис. 1–3). Активность ЦО и пируваткиназы была ниже в РГ3 относительно первых двух размерных групп. Активность альдолазы у рыб была выше в РГ1 по сравнению с РГ2 и РГ3, значения этого фермента у особей в РГ3 были самыми низкими. Активность 1-ГФДГ у рыб была ниже в РГ2 относительно РГ1 и РГ3. Различия в активности исследуемых ферментов у рыб разных размерных групп могут быть обусловлены их созреванием и, соответственно, увеличением

размеров, что сопровождается метаболическими перестройками, направленными на усиление генеративного обмена в процессе роста рыб (Чурова и др., 2010, Soengas *et al.*, 1993).

#### Активность ферментов в мышцах

При исследовании активности ферментов ЦО, ЛДГ, альдолазы и пируваткиназы в мышцах особей форели стабильных различий между группами «Корм №1» и «Корм №2» не было выявлено (табл. 2).

Уровень активности ЛДГ в мышцах форели во всех размерных группах, как правило, увеличивался на втором месяце исследования (относительно первого месяца) (табл. 2), что может

**Таблица 2.** Активность ферментов в мышцах особей форели из разных размерных групп, питавшихся разными кормами (мкмоль/мин/мг белка)

Показатель	Группа	30 дней		60 дней	
		30 мин	24 ч	30 мин	24 ч
Размерная группа 1 (РГ1)					
ЦО	Корм 1	0.010 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.012 ± 0.003	0.010 ± 0.001
	Корм 2	0.012 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.013 ± 0.003	0.009 ± 0.001
ЛДГ	Корм 1	2.26 ± 0.23	1.86 ± 0.19	3.81 ± 0.33 <sup>a</sup>	3.67 ± 0.11 <sup>a</sup>
	Корм 2	2.35 ± 0.22	1.80 ± 0.17	3.69 ± 0.20 <sup>a</sup>	4.18 ± 0.16 <sup>*a</sup>
Альдолаза	Корм 1	0.47 ± 0.02	0.52 ± 0.03	0.42 ± 0.03	0.39 ± 0.04
	Корм 2	0.48 ± 0.04	0.46 ± 0.04	0.46 ± 0.03	0.40 ± 0.03
ПК	Корм 1	2.23 ± 0.18	2.42 ± 0.12	2.22 ± 0.09	1.83 ± 0.17
	Корм 2	2.72 ± 0.13	3.47 ± 0.52	1.78 ± 0.20 <sup>a</sup>	2.01 ± 0.12
Размерная группа 2 (РГ2)					
ЦО	Корм 1	0.010 ± 0.002	0.009 ± 0.001	0.013 ± 0.004	0.015 ± 0.003
	Корм 2	0.009 ± 0.001	0.014 ± 0.001 <sup>*b</sup>	0.016 ± 0.003	0.014 ± 0.002
ЛДГ	Корм 1	2.50 ± 0.26	2.65 ± 0.35	3.66 ± 0.17 <sup>a</sup>	3.75 ± 0.25 <sup>a</sup>
	Корм 2	2.58 ± 0.26	2.98 ± 0.17	4.43 ± 0.41 <sup>a</sup>	3.56 ± 0.38
Альдолаза	Корм 1	0.41 ± 0.08	0.32 ± 0.03	0.57 ± 0.08	0.40 ± 0.04
	Корм 2	0.41 ± 0.04	0.34 ± 0.04	0.41 ± 0.03	0.32 ± 0.04
ПК	Корм 1	2.79 ± 0.19	2.87 ± 0.31	3.59 ± 0.26 <sup>a</sup>	3.36 ± 0.43
	Корм 2	2.96 ± 0.07	3.24 ± 0.26	3.21 ± 0.28	3.34 ± 0.35
Размерная группа 3 (РГ3)					
ЦО	Корм 1	0.019 ± 0.003	0.013 ± 0.001	0.014 ± 0.002	0.013 ± 0.001
	Корм 2	0.013 ± 0.002	0.011 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.013 ± 0.002
ЛДГ	Корм 1	4.72 ± 0.31	4.18 ± 0.15	6.04 ± 0.36	6.26 ± 0.32 <sup>a</sup>
	Корм 2	5.15 ± 0.43	4.46 ± 0.40	6.40 ± 0.36	7.27 ± 0.73 <sup>a</sup>
Альдолаза	Корм 1	0.38 ± 0.04	0.40 ± 0.02	0.38 ± 0.01	0.37 ± 0.05
	Корм 2	0.39 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.28 ± 0.03 <sup>*a</sup>	0.35 ± 0.04
ПК	Корм 1	4.35 ± 0.29	4.36 ± 0.21	5.45 ± 0.33 <sup>a</sup>	4.38 ± 0.46
	Корм 2	4.77 ± 0.39	4.76 ± 0.34	4.61 ± 0.42	4.20 ± 0.47

Примечание. \* – различия между группами «Корм №1» и «Корм №2» достоверны, <sup>a</sup> – различия между месяцами (30 дней и 60 дней) в соответствующей группе достоверны, <sup>b</sup> – различия по времени суток в соответствующей группе достоверны,  $p < 0.05$ .

указывать на увеличение роли анаэробного синтеза АТФ в мышцах (Voeuf, Le Bail, 1999). Анаэробный гликолиз, как известно, играет главную роль при высокой физической активности особей, характеризующейся быстрыми сокращениями белых мышц (Ellerby *et al.*, 2001). Наблюдаемое повышение активности ЛДГ в мышцах форели к концу эксперимента может быть связано с необходимостью в большем количестве энергии для плавательной рывковой активности рыб по мере увеличения их размеров (Burness *et al.*, 1999; Чурова и др., 2015).

Установлены различия в активности ферментов в мышцах особей форели разных размерных групп. Самый высокий уровень активности ЛДГ и пируваткиназы отмечен в мышцах рыб из РГЗ (табл. 2). Таким образом, активность данных ферментов была тем выше, чем крупнее особи, что, вероятно, объясняется интенсификацией анаэробного метаболизма в связи с необходимостью более высокого уровня образования АТФ для энергообеспечения физической активности.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ уровня активности ферментов энергетического и углеводного обмена в печени позволил оценить влияние кормов с отличающимся составом их ингредиентов на направление метаболических путей. Установлен повышенный уровень активности ферментов Г6ФДГ и 1-ГФДГ в печени у рыб из группы «Корм №2» по сравнению с группой «Корм 1», что указывает на увеличение степени использования углеводов в процессах биосинтеза липидов. Эти результаты позволяют предположить, что, несмотря на то что, согласно данным производителей, процент содержания БЖУ в кормах сходный, прежде всего имеют значение состав и количественное соотношение ингредиентов, и, главным образом, источник происхождения белков, жиров и углеводов (животного и растительного).

В первый год развития наиболее чувствительны к использованию кормов отличающегося состава рыбы, меньшие по массе (с массой в начале исследования 200 и 500 грамм). Время отбора проб, а именно наличие суточного голодания рыб, на активность исследуемых ферментов в мышцах и печени не оказывало влияния, за исключением изменения активности пируваткиназы в печени. Различия в активности ферментов ЦО, ЛДГ, альдолазы, Г6ФДГ и 1-ГФДГ в печени и мышцах рыб в зависимости от месяца сбора проб и принадлежности к размерной группе связаны, вероятнее всего, с перестройками в метаболизме в сторону генеративного обмена по мере увеличения их массы.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа финансировалась из средств федерального бюджета, выделенных на выполнение темы государственного задания КарНЦ РАН FMEN-2022-0006. Работа выполнена с использованием научного оборудования ЦКП КарНЦ РАН.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтического комитета ИБ КарНЦ РАН, протокол № 8 от 12.12.2023.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия // Минск: Изд-во Беларусь. 1976. 311 с.
- Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии // М.: Высш. шк. 1980. 272 с.
- Озернюк Н.Д. Энергетический обмен в раннем онтогенезе рыб // М.: Наука. 1985. 175 с.
- Чурова М.В., Мецеракова О.В., Веселов А.Е., Немова Н.Н. Активность ферментов энергетического и углеводного обмена и уровень некоторых молекулярно-генетических показателей у молоди лосося (*Salmo salar* L.), различающейся возрастом и массой // Онтогенез. 2015. Т. 46. № 5. Р. 304–312. <https://doi.org/10.1134/S1062360415050021>
- Чурова М.В., Мецеракова О.В., Немова Н.Н., Шатуновский М.И. Соотношение роста и некоторых биохимических показателей рыб на примере микижи *Parasalmo mykiss* Walb. // Известия РАН. Сер. Биол. 2010. № 3. С. 289–299.
- Barroso J.B., Garcia-Salguero L., Peragon J., de la Higuera M., Lupiañez J.A. Effects of long-term starvation on the NADPH production systems in several different tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Paris: INRA. 1993. P. 333–338.
- Bastrop R., Jurss K., Wacke R. Biochemical parameters as a measure of food availability and growth in immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Comparative Biochemistry and Physiology. 1992. V. 102. P. 151–161. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(92\)90028-0](https://doi.org/10.1016/0300-9629(92)90028-0)

- Boeuf G., Le Bail P.Y.* Does light have an influence on fish growth? // *Aquaculture*. 1999. V. 177. № 1–4. P. 129–152. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00074-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00074-5)
- Bradford M.M.* Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. № 1–2. P. 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bücher T., Pfeleiderer G.* Pyruvate kinase from muscle // *Methods in Enzymology*. 1955. V. 1. P. 345–440.
- Burness G.P., Leary S.C., Hochachka P.W., Moyes C.D.* Allometric scaling of RNA, DNA, and enzyme levels in fish muscle // *Am. J. Physiol.* 1999. V. 277. P. R1164–R1170. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.277.4.R1164>
- Ellerby D.J., Altringham J.D.* Spatial variation in fast muscle function of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* during fast-starts and sprinting // *J. Exp. Biol.* 2001. V. 204. P. 2239–2250. <https://doi.org/10.1242/jeb.204.13.2239>
- Enyu Y.-L., Shu-Chien A.C.* Proteomics analysis of mitochondrial extract from liver of female zebrafish undergoing starvation and refeeding // *Aquacult. Nutr.* 2011. V. 17. № 2. P. e413–e423. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00776.x>
- Gauthier C., Campbell P., Couture P.* Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*) // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*. 2008. V. 151. P. 526–532. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.010>
- Harmon J.S., Sheridan M.A.* Glucose-stimulated lipolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver // *J. Fish Physiol. Biochem.* 1992. V. 10. P. 189–199. <https://doi.org/10.1007/bf00004513>
- Johansen K.A., Overturf K.* Alterations in expression of genes associated with muscle metabolism and growth during nutritional restriction and refeeding in rainbow trout // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2006. V. 144. P. 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.02.001>
- Konradt J., Braunbeck T.* Alterations of selected metabolic enzymes in fish following longterm exposure to contaminated streams // *J. Aquat. Ecosystem Stress Recovery*. 2001. V. 8. P. 299–318. <https://doi.org/10.1023/a:1012928914322>
- Kumar V., Sahu N.P., Pal A.K., Kumar S., Sinha A.K., Ranjan J., Baruah K.* Modulation of key enzymes of glycolysis, gluconeogenesis, amino acid catabolism, and TCA cycle of the tropical freshwater fish *Labeo rohita* fed gelatinized and non-gelatinized starch diet // *Fish Physiology and Biochemistry*. 2010. V. 36. P. 491–499. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9319-5>
- Llewellyn L., Sweeney G.E., Ramsurn V.P., Rogers S.A., Wigham T.* Cloning and unusual expression profile of the aldolase B gene from Atlantic salmon // *BBA Gene Structure and Expression*. 1998. V. 1443. № 3. P. 375–380. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(98\)00229-2](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(98)00229-2)
- Meton I., Mediavilla D., Caseras A., Canto E., Fernandez F., Baanante I.V.* Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) // *Br. J. Nutr.* 1999. V. 82. P. 223–232. <https://doi.org/10.1017/S0007114599001403>
- Peragon J., Barroso J.B., Garcia-Salguero L., de la Higuera M., Lupianez J.A.* Carbohydrates affect protein-turnover rates, growth, and nucleic acid content in the white muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Aquaculture*. 1999. V. 179. P. 425–437. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00176-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00176-3)
- Small B.C., Soares J.H.Jr.* Effect of dietary carbohydrate on growth, glucose tolerance and liver composition of juveniles striped bass // *North American Journal of Aquaculture*. 1999. V. 61. P. 286–292. [https://doi.org/10.1577/1548-8454\(1999\)061%3C0286:EODCOG%3E2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8454(1999)061%3C0286:EODCOG%3E2.0.CO;2)
- Smith L.* Spectrophotometric assay of cytochrome C oxidase // *Methods in Biochem. Analysis*. 1955. V. 2. P. 427–434. <https://doi.org/10.1002/9780470110188.ch13>
- Soengas J.L., Sanmartin B., Barciela P., Aldegunde M., Rozas G.* Changes in carbohydrate metabolism related to the onset of ovarian recrudescence in domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Comp. Biochem. and Physiol. Part A: Physiology*. 1993. V. 105. P. 293–301. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(93\)90211-L](https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90211-L)
- Somero G.N., Childress J.J.* A violation of the metabolism-size scaling paradigm: activities of glycolytic enzymes in muscle increase in larger size fish // *Physiol. Zool.* 1980. V. 53. № 3. P. 322–337. <https://doi.org/10.1086/physzool.53.3.30155794>
- Talukdar A., Kumar S., Varghese T., Jain K.K., Sahu N.P., Sahoo S.* Feeding gelatinized carbohydrate in the diets of magur, *Clarias batrachus* (Linnaeus, 1758): Effects on growth performance, enzyme activities and expression of muscle regulatory factors // *Aquaculture Research*. 2019. V. 50. P. 765–777. <https://doi.org/10.1111/are.13933>
- Tian W.N., Braunstein L.D., Pang J., Stuhlmeier K.M., Xi Q.C., Tian X., Stanton R.C.* Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 10609–10617. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.17.10609>
- Treberg J.R., Lewis J.M., Driedzic W.R.* Comparison of liver enzymes in osmerid fishes: key differences between a glycerol accumulating species, rainbow smelt (*Osmerus mordax*), and a species that does not accumulate glycerol, capelin (*Mallotus villosus*) // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2002. V. 132. P. 433–438. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00083-1](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00083-1)
- Yengkokpam S., Sahu N.P., Pal A.K., Mukherjee S.C., Debnath D.* Gelatinized carbohydrates in the diet of *Catla catla* fingerlings: effect of levels and sources on nutrient utilization, body composition and tissue enzyme activities // *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2007. V. 20. № 1. P. 89–99. <https://doi.org/10.5713/ajas.2007.89>

**Activity of energy and carbohydrate metabolism enzymes  
in Rainbow Trout fingerlings (*Oncorhynchus mykiss* Walb.)  
when feeding two types of commercial feed**

**M. A. Rodin<sup>#</sup>, M. V. Kuznetsova, M. Yu. Krupnova, A. E. Kuritsyn,  
S. A. Murzina, N. N. Nemova**

*Institute of Biology is a separate division of the Federal Research Center  
“Karelian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”, st. Pushkinskaya, 11, Petrozavodsk, 185910 Russia  
<sup>#</sup>E-mail: mikhail.rodin.mr@yandex.ru*

We studied the activity of energy and carbohydrate metabolism enzymes (cytochrome *c* oxidase, lactate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, 1-glycerophosphate dehydrogenase, pyruvate kinase, aldolase) in the muscles and liver of rainbow trout of three size groups aged 5, 10 and 12 months under the influence of two types of commercial feeds with different composition. The levels of activity of the enzymes G6PDH, 1-GPDH and aldolase in the liver were significantly higher in fish from the “Feed №2” group. The identified differences in the activity of enzymes in the liver of fish suggest that feed №2 to a greater extent (compared to feed №1) promotes the use of carbohydrates in lipid biosynthesis. Differences in the activity of the enzymes COX, LDH, aldolase, G6PDH and 1-GPDH in the liver and muscles of fish depending on the month of sampling and belonging to the size group are most likely associated with changes in the metabolism of fish as their weight increases towards generative metabolism.

*Keywords:* Rainbow Trout, energy metabolism, enzyme activity, feed composition

УДК 575.224.22:575.174.015.3

## АНАЛИЗ МУТАЦИЙ ТИПА G:C>T:A, G:C>A:T И G:C>C:G В ГЕНЕ TP53 У ОБЛУЧЕННЫХ ЖЕНЩИН С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И БЕЗ В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ХРОНИЧЕСКОГО РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

© 2024 г. В. С. Никифоров\*, \*\*, @, А. В. Кореченкова\*, А. В. Аклеев\*, \*\*

\*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

“Уральский научно-практический центр радиационной медицины” ФМБА России,  
лаборатория молекулярно-клеточной радиобиологии, ул. Воровского, д. 68, корп. А, г. Челябинск, 454141 Россия

\*\*Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования

“Челябинский государственный университет”, кафедра радиационной биологии,  
ул. Братьев Кашириных, д. 129, г. Челябинск, 454001 Россия

@E-mail: nikiforovx@mail.ru

Поступила в редакцию 15.02.2024 г.

После доработки 28.04.2024 г.

Принята к публикации 02.05.2024 г.

Работа представляет результаты анализа мутаций типа G:C>T:A, G:C>A:T и G:C>C:G в гене TP53 в клетках периферической крови у 24 женщин с раком молочной железы и у 17 женщин без такового, подвергшихся хроническому облучению. Было обнаружено 17 различных вариантов, представляющих собой однонуклеотидные замены. Различия частот носителей обнаруженных вариантов между группой сравнения и основной не достигали статистически значимого уровня. Все обнаруженные варианты присутствовали в базе данных IARC TP53 и не имели клинического значения как «патогенные». Несмотря на отсутствие статистически значимых различий, вопрос о влиянии хронического низкоинтенсивного радиационного воздействия на частоту мутаций в гене TP53 остается открытым и требует дальнейших исследований с привлечением большего объема данных.

**Ключевые слова:** TP53, секвенирование по Сэнгеру, река Теча, хроническое облучение, малые и средние дозы, трансверсия

**DOI:** 10.31857/S1026347024060043, **EDN:** uksksu

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее часто диагностируемым раком и ведущей причиной смерти от рака у женщин по всему миру и составляет 23% от всех случаев рака и 14% от смертности, связанной со всеми видами рака (Кулигина, 2010). Молочная железа у женщин является одним из наиболее радиочувствительных органов, и воздействие ионизирующего излучения (ИИ) играет большую роль в радиационно-индуцированном канцерогенезе и развитии РМЖ (UNSCEAR, 2006). Увеличение риска РМЖ у женщин наблюдалось после многократных рентгеновских обследований, радиотерапии, после атомных бомбардировок в Японии (Preston *et al.*, 2007, 2016).

В этиологию РМЖ вовлечены как генетические факторы, так и факторы образа жизни и окружающей среды. Близнецовое исследование вклада наследственных факторов в риск развития злокачественных новообразований выявило статистически значимый эффект наследственных факторов для

РМЖ (27%; 95% доверительный интервал (ДИ), 4–41%) (Lichtenstein *et al.*, 2000). Негенетические факторы включают менструальную и репродуктивную историю, индекс массы тела, употребление алкоголя, физическую активность, воздействие ионизирующего излучения (ИИ) (Кулигина, 2010; Kleibl, Kristensen, 2016).

Известные на сегодняшний день генетические варианты, связанные с риском РМЖ, классифицируются как высоко пенетрантные (в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *CDH1*), которые редко встречаются в популяции и ассоциированы с высоким относительным риском (RR) носителей по сравнению с неносителями (5 – 20>); умеренно пенетрантные варианты с умеренно повышенным риском (в генах *ATM*, *CHEK2*, *BRIPI*, *PALB2*) и слабо пенетрантные варианты, которые встречаются часто и связаны с небольшим увеличением риска (RR <1,5) (Кулигина, 2010; Ripperger *et al.*, 2009).

*TP53* является ключевым супрессором опухоли, участвующим в нескольких путях клеточного ответа на стресс, которые регулируют клеточный цикл, апоптоз, старение и восстановление ДНК. *TP53* (OMIM #191170) расположен на 17 хромосоме (17p13.1) и кодирует транскрипционный фактор p53. Канонический белок p53 (p53α) представляет собой наиболее распространенную изоформу, кодируемую *TP53*, который состоит из 11 экзонов и 10 интронов. Другие изоформы p53 являются результатом альтернативного сплайсинга, действия альтернативных промоторов и альтернативной инициации трансляции.

Большинство соматических и наследуемых вариантов гена *TP53*, обнаруженных в раковых клетках, являются миссенс-мутациями, находящимися наиболее часто в ДНК-связывающем домене белка. Эти мутации нарушают способность белка связываться с таргетными последовательностями ДНК и, таким образом, предотвращают транскрипционную активацию этих генов. Кроме того, *TP53* высоко полиморфен как в кодирующих, так и в некодирующих областях. По данным международного агентства по исследованию рака, большинство подтвержденных полиморфизмов *TP53* расположено в интронных областях гена (IARC *TP53* Database). И на сегодняшний день существует множество исследований, показывающих, что некоторые полиморфизмы, как интронные, так и экзонные, повышают восприимчивость к раку и модифицируют фенотипы рака у носителей мутаций *TP53* (Anoushirvani *et al.*, 2018; Assad *et al.*, 2019).

Около 30% миссенс-мутаций *TP53* обнаруживаются при развитии рака в высокомутабельных областях человеческого гена – CpG-островках, где частоты цистеиновых и гуаниновых оснований сравнительно выше (Jafrin *et al.*, 2020). И в результате оксидативного стресса, возникшего под действием эндогенных и/или экзогенных агентов, в том числе и ИИ, гуанин может легко подвергаться окислению из-за низкого окислительно-восстановительного потенциала (Steenken, Jovanovic,

1997). Могут возникать повреждения ДНК, приводящие к трансверсиям G:C>T:A, G:C>C:G и транзициям G:C>A:T (Ming, 2014; Kino, 2017). Так, отмечается увеличение числа переходов G>T в гене *TP53* у курящих пациентов с раком легких (Rodin, Rodin, 2004), а также у людей с раком кожи, вызванным УФ-излучением (Dumaz, 1999). При воздействии нейтронного облучения на мышинных моделях наблюдалась положительная корреляция между числом транзиций C:G>T:A и продолжительностью роста опухоли молочной железы (Moriyama, 2021).

Целью настоящей работы был анализ мутаций типа G:C>T:A, G:C>A:T и G:C>C:G гена *TP53* в клетках периферической крови у женщин с раком молочной железы и без такового, подвергшихся хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Секвенирование по Сэнгеру гена *TP53* было проведено для 41 женщины из когорты реки Течи. В ходе работы было сформировано 2 выборки: в первую вошли 24 женщины, имеющие в своем анамнезе РМЖ, во вторую вошли 17 женщин, не имеющие злокачественных новообразований (ЗНО). Характеристика исследуемых групп представлена в табл. 1. При формировании обследованных групп были использованы следующие критерии включения в исследование:

1) облученные лица из когорты реки Течи – постоянно проживавшие в одном из 41 сел, расположенных на побережье реки Течи, в период с 01.01.1950 по 31.12.1960;

2) наличие рассчитанной индивидуальной поглощенной накопленной дозы облучения красного костного мозга (ККМ), тимуса и периферических лимфоидных органов (Дегтева и др., 2019).

Средний возраст женщин с РМЖ составил  $69.9 \pm 1.1$  год, (диапазон: 62.0–79.0 лет), у женщин без РМЖ  $71.5 \pm 1.4$  (диапазон: 58.0–82.0 лет).

**Таблица 1.** Характеристика исследуемых групп

Показатель		С РМЖ	Без РМЖ	Уровень значимости различий, p
Объем выборки		N=24	N=17	
Этническая группа	Славяне	15 (62.6)	8 (53.3)	$\chi^2 = 0.321$ $p = 0.572$
	Тюрки	9 (33.4)	7 (46.7)	
		<b>M±SE (min-max)</b>		
Возраст, лет		$69.9 \pm 1.1$ (62.0–79.0)	$71.5 \pm 1.4$ (58.0–82.0)	0.40
Доза облучения ККМ, мГр		$693.3 \pm 168.4$ (25.0 – 3507.1)	$604.0 \pm 191.3$ (2.0–2740.0)	0.39
Доза облучения тимуса и периферических лимфоидных органов, мГр		$96.0 \pm 25.8$ (8.0–596.5)	$92.2 \pm 45.4$ (0.8–780.0)	0.16

По этнической принадлежности в двух выборках численно преобладали славянские женщины.

Индивидуальные накопленные дозы облучения на ККМ у женщин с РМЖ составляли от 25.0 до 3507.1 мГр (среднее значение и ошибка среднего –  $693.3 \pm 168.4$  мГр ( $M \pm SE$ )). Индивидуальные накопленные дозы облучения на тимус и периферические лимфоидные органы находились в диапазоне от 8.0 до 596.5 мГр (среднее значение и ошибка среднего –  $96.0 \pm 25.8$  мГр).

В группе женщин без РМЖ индивидуальные накопленные дозы, в перерасчете на ККМ, составили от 2.0 до 2740.0 мГр (среднее значение и ошибка среднего –  $604.0 \pm 191.3$  мГр), индивидуальные накопленные дозы облучения, в перерасчете на тимус и периферические лимфоидные органы, находились в диапазоне от 0.8 до 780.0 мГр (среднее значение и ошибка среднего –  $92.2 \pm 45.4$  мГр).

Источником ДНК служили образцы цельной крови, которые хранились в биобанке лаборатории молекулярно-клеточной радиобиологии ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ .

ДНК выделяли методом органической экстракции с помощью набора реагентов Extra Phen (ООО НПФ «АТГ-Биотех», Россия). Количество ДНК и чистоту образцов ДНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). Значения отношения A260/A280 находились в интервале 1.7–1.9. С помощью программы Primer Designer™ Tool (Thermo Scientific, США) были выбраны праймеры для ПЦР фрагментов ДНК, перекрывающих 2–11 экзоны гена TP53, и их секвенирования по Сэнгеру (табл. 2).

ПЦР проводили в амплификаторе C1000™ ThermalCycler (Bio-Rad, США). Наличие целевого продукта в ПЦР смеси после проведения амплификации оценивали с помощью агарозного гель-электрофореза. С помощью набора ExoSAP-IT (Thermo Fisher, USA) осуществлялась ферментативная очистка продуктов ПЦР. По завершении очистки проводили секвенирующую реакцию. На 5' конце праймеров для ПЦР находился универсальный сайт прикрепления секвенирующих праймеров (M13). Олигонуклеотиды были синтезированы

**Таблица 2.** Праймеры для ПЦР фрагментов ДНК, перекрывающих 2–11 экзоны гена TP53

№ п/п	Последовательности праймеров (5'→3')	№ ампликона	Длина, п.н.
1	F: GGGACTGTAGATGGGTGAAAAGAG R: CTGTCTCAGACACTGGCATGGT	1	463
2	F: GAATCCCAAAGTTCCAAACAAAAGAA R: AGACTTCCTGAAAACAACGTTCTG	2	500
3	F: GAGAGATGCTGAGGGTGTGATG R: CTGGGCTTCTTGCACTCTGG	3	274
4	F: GTGAACAGATAAAGCAACTGGAAGAC R: ATCCCATCACACCCTCAGCATCT	4	511
5	F: CTCATAGGGCACCACCACACTA R: CTGAGGTGTAGACGCCAACTCT	5	517
6	F: GGGAGGCCCTTAGCCTCTGTAA R: TTTGCCAACTGGCCAAGACC	6	546
7	F: AAAGAGAAGCAAGAGGCAGTAAGG R: CTTGCCACAGGTCTCCCAAG	7	497
8	F: TGTTGTTGGGCAGTGCTAGGA R: CATACTACTACCCATCCACCTCTC	8	494
9	F: CATCTGTATCAGGCAAAGTCATAGAAC R: CAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAA	9	506
10	F: TAAAAGTAGGCTAGGCAGGCC R: AAGGACCAGACCAGCTTTCAA	10	531
11	F: GGCTGGGAGTTGCGGAGAAT R: GCAGTTTCTACTAAATGCATGTTGCTT	11	488
12	F: GGACAGCTTCCCTGGTTAGTACGG R: GGGTGTGGCCACCATCTTGA	12	566
13	F: CAAGTCTTGGTGGATCCAGATCAT R: CCACTGAACAAGTTGGCCTGC	13	578
14	F: TTCACCCCTCAGACACACAGGT R: TCCCACACCCTGGAGGATTTTCA	14	543
15	F: GGCTCAGCCTTGCTAAATCAGA R: CAGCTGGAAGGGTCAACATCTT	15	493

фирмой Invitrogen (США), последовательности: Forward – GTTGTAACGACGGCCAGTG, Reverse – AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA. Для секвенирования использовали BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher, США). Условия проведения циклического секвенирования представлены в табл. 3. Секвенирующие смеси очищали с помощью BigDyeX Terminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, США). Сборку контиг, выравнивание последовательностей, сравнение с референтной последовательностью гена TP53 (NG\_017013.2) выполняли с помощью программы SeqScape v2.7 (Thermo Fisher, США). Биологическое значение детектированных вариантов анализировали с помощью базы данных IARC TP53 Database (Bouaoun *et al.*, 2016).

Значимость различий частоты встречаемости носителей вариантов секвенированной в нашем исследовании последовательности TP53 гена между основной группой и группой сравнения оценивали с помощью точного теста Фишера. Уровень значимости установили  $p < 0.05$ . Расчеты производили с помощью ПО Statistica V. 10.0.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Секвенирование экзонных (2–11 экзоны) и фланкирующих интронных регионов гена TP53 в образцах геномной ДНК всех обследованных лиц

выявило 17 различных вариантов, представляющих собой однонуклеотидные замены, представленные на рис. 1. Два варианта находились в кодирующих регионах: rs1042522 (4 экзон) и rs762846821 (5 экзон). 15 вариантов находились в некодирующей области гена: из которых 10 вариантов: rs1642785, rs138066738, rs1039127691, rs540683791, rs17883323, rs35850753, rs543198710, rs12947788, rs77697176, rs1385420854 – были представлены заменами в интронах, один вариант rs2909430 располагался в 5'НТО (5'-нетранслируемой области), а четыре варианта – rs4968187, rs199729221, rs17884306 и rs1614984 – в 3'НТО (3'-нетранслируемой области) гена TP53. Вариант rs1614984 являлся вариантом последовательности, расположенной в пределах половины килобазы от конца гена.

Ни один из обнаруженных вариантов не имел клинического значения как «патогенный» или «вероятно патогенный» согласно базе данных NCBI ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>). Все из обнаруженных нами вариантов присутствовали в базе данных IARC TP53 Database. Обнаруженные варианты последовательности представлены в табл. 4

В табл. 5 представлены частоты встречаемости носителей вариантов гена TP53 в группах обследованных женщин с РМЖ и без такового. Как видно из данных, различия частот носителей обнаруженных вариантов гена TP53 между двумя исследуемыми группами не достигали статистически значимого

Таблица 3. Условия проведения циклического секвенирования

	Стадия				
	Инкубация	25 циклов			Хранение до стадии очистки
		Денатурация	Отжиг	Элонгация	
Скорость нарастания	–	1°C/сек			
Температура	96°C	96°C	50°C	60°C	4°C
Время	01:00	00:10	00:05	04:00	∞



Рис. 1. Обнаруженные замены в гене TP53.

**Таблица 4.** Описание обнаруженных вариантов гена TP53 у обследованных женщин из когорты реки Течи

№	Расположение (GRCh38.p14 chr 17)	кДНК	ОНП	Расположение	№ кодона	Тип замены/ область замены
1	g.7676483G>C	c.74+38C>G	rs1642785	2-интрон	0	Интронный вариант
2	g.7676340G>C	c.96+42C>G	rs138066738	3-интрон	0	Интронный вариант
3	g.7676328C>T	c.96+54G>A	rs1039127691	3-интрон	0	Интронный вариант
4	g.7676324C>G	97-52G>A	rs540683791	3-интрон	0	Интронный вариант
5	g.7676301G>T	c.97-29C>A	rs17883323	3-интрон	0	Интронный вариант
6	g.7676154G>C	c.215C>G	rs1042522	4-экзон	72	Миссенс-вариант
7	g.7675353C>T	c.376-117G>A	rs35850753	4-интрон	0	Интронный вариант
8	g.7675327C>T	c.376-91G>A	rs2909430	4-интрон	0	5'НТО
9	g.7675151C>T	c.461G>A	rs762846821	5-экзон	154	Миссенс-вариант
10	g.7674754G>A	c.672+105C>T	rs543198710	6-интрон	0	Интронный вариант
11	g.7674109G>A	c.782+72C>T	rs12947788	7-интрон	0	Интронный вариант
12	g.7673183G>A	c.993+352C>T	rs77697176	9-интрон	0	Интронный вариант
13	g.7673051G>A	c.993+484C>T	rs1385420854	9-интрон	0	Интронный вариант
14	g.7669124C>T	c.*485G>A	rs4968187	11-экзон	0	3'НТО
15	g.7668855G>A	c.*754C>T	rs199729221	11-экзон	0	3'НТО
16	g.7668783C>T	c.*826G>A	rs17884306	11-экзон	0	3'НТО
17	g.7668134G>A	c.*1475C>T	rs1614984	3'НТО	0	3'НТО

уровня. Также не было выявлено дозовых зависимостей наличия трансверсий в исследуемых группах.

TP53 содержит более 100 подтвержденных, встречающихся в природе однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП), но только некоторые из них были изучены на предмет влияния на функции p53. Наиболее охарактеризованным экзонным ОНП является немолчащая замена кодона 72 в экзоне 4 (rs1042522, g.7676154G>C, p. Pro72Arg), которая присутствует у населения при частоте минорного аллеля от 10% (европейцы, Северная Европа) до 50% (африканцы, йоруба) (Hainaut, Pfeifer, 2016). Этот ОНП определяет варианты белка с различными функциональными свойствами. Вариант p53, имеющий полиморфный аллель, кодирующий аргинин (G), обладает более сильным апоптотическим потенциалом, в то время как вариант, кодирующий пролин (C), более эффективно индуцирует остановку клеточного цикла и восстановление ДНК (Eiholzer *et al.*, 2020). Несмотря на отсутствие

статуса «патогенный» в базе ClinVar, к настоящему дню накопилось немало исследований, демонстрирующих ассоциацию этого полиморфизма с различными типами ЗНО. Так, rs1042522 является одним из 25 ОНП, которые, как сообщается, независимо представляют незначительный, но кумулятивно значимый повышенный риск развития рака молочной железы (Johnson *et al.*, 2007). Отмечена повышенная частота rs1042522 у женщин с РМЖ, облученных в результате деятельности Семипалатинского полигона с расчетной эффективной эквивалентной дозой 500 мЗв, по сравнению с необлученной контрольной группой имеющих РМЖ (Arsalnikov *et al.*, 2016). Кроме того, полиморфизм может быть связан с риском радиационно-индуцированной поздней кожной токсичности (отношение шансов (ОШ) на аллель C: 1.79, 95% ДИ: 1.06–3.02, p = 0.028) у пациенток с раком молочной железы, получавших адьювантную лучевую терапию в общей дозе 50 Гр (Cargnin *et al.*, 2021).

**Таблица 5.** Частота встречаемости гомо- и гетерозиготных носителей вариантов гена TP53 у женщин с РМЖ и без

	ОНП	MAF*, %	Женщины без РМЖ (n = 17)		Женщины с РМЖ (n = 24)		p
			Количество человек	Частота, абс.	Количество человек	Частота, абс.	
1	rs1642785	0.42	14	0.82	14	0.58	0.17
2	rs138066738	0.02	2	0.12	2	0.08	1.00
3	rs1039127691	<0.01	1	0.06	2	0.08	1.00
4	rs540683791	<0.01	1	0.06	1	0.04	1.00
5	rs17883323	0.08	1	0.06	1	0.04	1.00
6	rs1042522	0.46	14	0.82	15	0.63	0.29
7	rs35850753	0.01	0	0	2	0.08	0.50
8	rs2909430	0.33	17	1	22	0.92	0.50
9	rs762846821	<0.01	1	0.06	0	0	0.41
10	rs543198710	<0.01	0	0	1	0.04	0.58
11	rs12947788	0.18	2	0.12	4	0.17	1.00
12	rs77697176	0.02	3	0.18	3	0.13	0.67
13	rs1385420854	<0.01	11	0.65	15	0.63	1.00
14	rs4968187	0.05	4	0.24	2	0.08	0.21
15	rs199729221	<0.01	12	0.71	12	0.50	0.21
16	rs17884306	0.06	3	0.18	0	0	0.06
17	rs1614984	0.38	10	0.59	12	0.50	0.75

Примечания. \* Усредненная частота минорного аллеля для европеоидных популяций (<http://www.ensembl.org>)

В нашем исследовании был обнаружена еще одна замена, расположенная в 5 экзоне (rs762846821, g.7675151C>T, p. Gly154Val). Данных относительно рисков развития РМЖ в литературе не было обнаружено, однако есть сообщения вероятной патогенности варианта относительно карциномы тимуса (Szpechcinski *et al.*, 2022).

Открытие различных изоформ TP53 (p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 40p53 $\alpha/\beta/\gamma$ ,  $\Delta$ 133p53 $\alpha/\beta/\gamma$ ,  $\Delta$ 160p53 $\alpha/\beta/\gamma$ ), двух новых экзонов, локализованных в интроне 9, и альтернативного промотора (P2) в интроне 4 позволяет предположить, что традиционная стратегия скрининга должна быть расширена за счет этих областей.

Вариант rs2909430 (g.7675327C>T), находящийся в области CpG островка (Anoushirvani *et al.*, 2018), и вариант rs35850753 (g.7675353C>T) находятся в регионе P2, ответственном за транскрипцию изоформы  $\Delta$ 133p53, лишенной домена трансактивации и части ДНК-связывающего домена. Предполагается, что эта изоформа может

ингибировать опухолесупрессирующие функции полноразмерного TP53 (Fujita *et al.*, 2009). В настоящее время неизвестно, влияют ли варианты в этом регионе на состояние гена TP53 и на его противоопухолевые функции (Aoubala *et al.*, 2011). Однако, сообщается, что гетерозиготность по rs1042522(GC) и rs2909430(AG) увеличивает риск развития рака в 5 раз. Комбинации ОНП были связаны с высокими уровнями мРНК  $\Delta$ 133TP53 и TP53 $\beta$ , повышенным уровнем инфилтрирующих иммунных клеток и более короткой выживаемостью пациентов при глиобластоме и раке простаты. Авторы показывают, что уровни белка  $\Delta$ 133p53 $\beta$  повышаются за счет ОНП, что приводит к усилению воспаления и способствует более агрессивному раку (Eiholzer *et al.*, 2020).

Значительная часть соматических мутаций располагается в интронах TP53 за пределами донорных или акцепторных сайтов сплайсинга. Такие интронные варианты зачастую не охватываются

традиционными программами секвенирования экзона и, следовательно, не регистрируются в базах данных мутаций. Обнаруженные нами 11 интронных замен были описаны в IARC TP53 Database, однако в литературе встречались исследования, описывающие лишь несколько из них.

Так, rs1642785 (g.7676483G>C) определяется как важный компонент сплайсинга интрона 2, а также системы поддержания стабильности мРНК и следовательно, принимающего участие в дифференциальной экспрессии изоформ-специфичных транскриптов гена TP53. (Pegliaud *et al.*, 2014). Наличие аллеля rs1642785\*С связывают с увеличением транскрипта с невырезанным интроном 2, и увеличением нестабильности пре-мРНК p53α.

В когорте больных хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ), подвергшихся воздействию ИИ на Чернобыльской АЭС, по сравнению с необлученным контролем с ХЛЛ обнаружено увеличение частоты гомозигот А/А по полиморфизму rs12947788 (g.7674109G>A), расположенному в интроне 7, однако данных о дозах облучения пациентов авторы не приводят (Vilous *et al.*, 2016).

3'НТО гена TP53 образует еще одну мишень для потенциальных изменений. У пациентов с В-клеточной лимфомой соматические варианты 3'НТО нарушают взаимодействие между мРНК TP53 и микроРНК-125b, что, возможно, приводит к нарушению регуляции сети TP53 (Li *et al.*, 2013).

Варианты rs4968187 (g.7669124C>T) и rs17884306 (g.7668783C>T) могут оказывать влияние на дестабилизацию мРНК и сплайсинг, изменяя структуру 3'НТО TP53 (Mucaki *et al.*, 2016). Стоит отметить, что в нашем исследовании различия в частотах генотипов по полиморфному локусу rs17884306 между группами облученных женщин, имеющих РМЖ и не имеющих, были близки к статистически значимому уровню. Тем не менее результатов, подтверждающих вклад этих ОНП в повышенный риск развития онкологических заболеваний, в литературе на данный момент нет.

Остальные полиморфизмы либо не были ассоциированы с какими бы то ни было канцерогенными эффектами (rs540683791, rs1614984, rs17883323), либо и вовсе не исследовались (rs138066738, rs1039127691, rs543198710, rs199729221).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования соматических мутаций на основе анализа трансверсий G:C>T:A, G:C>C:G и транзиций G:C>A:T гена TP53 в клетках периферической крови у женщин с РМЖ и без ЗНО в отдаленные сроки после хронического радиационного воздействия было выявлено семнадцать различных вариантов, представляющих собой однонуклеотидные замены.

В кодирующей части гена TP53 было обнаружено 2 варианта: rs1042522, расположенный в 4 экзоне, приводящий к замене пролина на аргинин (p.Pro72Arg), был обнаружен у 29 женщин (15 с РМЖ и 14 без РМЖ); rs762846821, находящийся в 5 экзоне, приводящий к замене глицина на аспарагиновую кислоту (p.Gly154Asp), был обнаружен у женщины без РМЖ. В группе у женщин с РМЖ были найдены 2 варианта, которые отсутствовали у женщин без РМЖ: rs35850753 в 4 интроне у 2 человек и rs543198710 в 6 интроне у 1 человека. Различия частот носителей обнаруженных вариантов гена TP53 между группой женщин с РМЖ и без РМЖ не достигали статистически значимого уровня. Важно отметить, что на четыре обнаруженных варианта (встречаемость без РМЖ/с РМЖ): rs138066738 (2/2), rs1039127691 (1/2), rs543198710 (0/1) и rs1385420854 (11/15) — на сегодняшний день не представлена информация о клинической значимости в базе данных NCBI ClinVar. Остальные обнаруженные варианты не имели клинического значения как «патогенный» или «вероятно патогенный». Тем не менее в литературе встречаются исследования, сообщающие о наличии повышенного риска развития ЗНО у лиц, подвергшихся действию ИИ как в результате медицинского облучения, так и в результате аварийных ситуаций, несущих полиморфные аллели rs1042522, rs2909430 и rs12947788. Кроме того, к сегодняшнему дню накопилось достаточно данных, на основании которых можно говорить о потенциально модифицирующей активности гена TP53 эффектах интронных полиморфизмов и ОНП нетранслируемых областей, влияющих на эффективность сплайсинга и транскрипцию изоформ TP53.

В данной работе была исследована оценка мутаций в гене TP53 у женщин с раком молочной железы в отдаленные сроки после хронического радиационного воздействия, однако результаты не показали статистически значимых различий или зависимостей. Это может быть связано с различными факторами, включая недостаточную мощность исследований или неучтенные вмешивающиеся переменные. Таким образом, вопрос о влиянии хронического низкоинтенсивного радиационного воздействия на частоту мутаций в гене TP53 остается открытым и требует дальнейших исследований с привлечением большего объема данных.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Модернизация высокотехнологичных методов, направленных на выявление медицинских последствий радиационных воздействий на персонал ПО «Маяк» и население Уральского региона» (шифр «Медицинские последствия-21»).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все участники исследования до включения в исследование добровольно подписали форму информированного согласия, утвержденную в составе протокола исследования Этическим комитетом ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России (протокол № 2 от 13 апреля 2023 г.).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дегтева М.О., Нанье Б.А., Толстых Е.И., Шишкина Е.А., Бугров Н.Г., Крестинина Л.Д., Аклеев А.В. Распределение индивидуальных доз в когорте людей, облученных в результате радиоактивного загрязнения реки Течи // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64. № 3. С. 46–53.  
DOI: 10.12737/article\_5cf2364cb49523.98590475.
- Кулигина Е.Ш. Эпидемиологические и молекулярные аспекты рака молочной железы // Практическая онкология. 2010. Т. 11. № 4. С. 203–216.
- Anoushirvani A.A., Aghabozorgi R., Ahmadi A. Arjomandzadegan M., Sahraei M., Khalili S., Fereydouni T., Khademi Z. Association of rs1042522 SNP with Clinicopathologic Factors of Breast Cancer Patients in the Markazi Province of Iran // Open Access Maced J Med Sci. 2018. Vol. 6. № 12. P. 2277–2282.  
DOI: 10.3889/oamjms.2018.486.
- Aoubala M., Murray-Zmijewski F., Khoury M.P., Fernandes K., Perrier S., Bernard H., Prats A.C., Lane D.P., Bourdon J.C. p53 directly transactivates  $\Delta 133p53\alpha$ , regulating cell fate outcome in response to DNA damage // Cell Death Differ. 2011. Vol. 18, №2. P. 248–258.  
DOI: 10.1038/cdd.2010.91.
- Apsalikov B., Manambaeva Z., Ospanov E., Massabayeva M., Zhabagin K., Zhagiparova Z., Maximov V., Voropaeva E., Apsalikov K., Belikhina T., Abdrahmanov R., Cherepkova E., Tanatarov S., Massadykov A., Urazalina N. BRCA1 and TP53 Gene-Mutations: Family Predisposition and Radioecological Risk of Developing Breast Cancer // Asian Pac J Cancer Prev. 2016. Vol. 17. № 8. P. 4059–4062. PMID: 27644661.
- Assad S.L., Javadirad S.M., Parsafar S. Tabatabaeian H., Ghaedi K., Azadeh M. TP53 rs1625895 is Related to Breast Cancer Incidence and Early Death in Iranian Population // Indian J Clin Biochem. 2019. Vol. 34. № 4. P. 485–489.  
DOI: 10.1007/s12291-018-0774-6.
- Bilous N.I., Abramenko I.V., Chumak A.A., Dyagil I.S., Martina Z.V. The distribution of TP53 gene polymorphisms in chronic lymphocytic leukemia patients, sufferers of Chernobyl nuclear power plant accident // Experimental Oncology. 2016. Vol. 38. № 4. P.252–256. PMID: 28230820.
- Bouaoun L., Sonkin D., Ardin M. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data // Hum. Mutat. 2016. Vol. 37. №9. P.865–876.  
DOI: 10.1002/humu.23035.
- Cargnin S., Barizzone N., Basagni C., Pisani C., Ferrara E., Masini L., D'Alfonso S., Krengli M., Terrazzino S. Targeted Next-Generation Sequencing for the Identification of Genetic Predictors of Radiation-Induced Late Skin Toxicity in Breast Cancer Patients: A Preliminary Study // J Pers Med. 2021. Vol. 11. № 10. P. 967.  
DOI: 10.3390/jpm11100967.
- Dumaz N., Drougard C., Sarasin A., Daya-Grosjean L. Specific UV-induced mutation spectrum in the p53 gene of skin tumors from DNA-repair-deficient xeroderma pigmentosum patients // Proc Natl Acad Sci USA. 1999. Vol. 90. 3 22. P. 10529–10533.  
DOI: 10.1073/pnas.90.22.10529.
- Eiholzer R.A., Mehta S., Kazantseva M., Drummond C.J., McKinney C., Young K., Slater D., Morten B.C., Avery-Kiejda K.A., Lasham A., Fleming N., Morrin H.R., Reader K., Royds J.A., Landmann M., Petrich S., Reddel R., Huschtscha L., Taha A., Hung N.A., Slatter T.L. Intronic TP53 Polymorphisms Are Associated with Increased  $\Delta 133TP53$  Transcript, Immune Infiltration and Cancer Risk // Cancers. 2020. Vol. 12. № 9. P. 2472.  
DOI: 10.3390/cancers12092472.
- Fujita K., Mondal A.M., Horikawa I. Nguyen G.H., Kumamoto K., Sohn J.J., Bowman E.D., Mathe E.A., Schetter A.J., Pine S.R., Ji H., Vojtesek B., Bourdon J.C., Lane D.P., Harris C.C. p53 isoforms Delta133p53 and p53beta are endogenous regulators of replicative cellular senescence // Nature Cell Biology. 2009. Vol. 11. № 9. P. 1135–1142.  
DOI: 10.1038/ncb1928.
- Jafrin S., Aziz M.A., Anonna S.N., Akter T., Naznin N.E., Reza S., Islam M.S. Association of TP53 Codon 72 Arg>Pro Polymorphism with Breast and Lung Cancer Risk in the South Asian Population: A Meta-Analysis // Asian Pac J Cancer Prev. 2020. Vol. 21. № 6. P. 1511–1519.  
DOI: 10.31557/APJCP.2020.21.6.1511.
- Johnson N., Fletcher O., Palles C., Rudd M., Webb E., Sellick G., dos Santos Silva I., McCormack V., Gibson L., Fraser A., Leonard A., Gilham C., Tavtigian S.V., Ashworth A., Houlston R., Peto J. Counting potentially functional variants in BRCA1, BRCA2 and ATM predicts breast cancer susceptibility // Human Molecular Genetics. 2007. Vol. 16. № 9. P. 1051–1057.  
DOI: 10.1093/hmg/ddm050.

- Hainaut P., Pfeifer G.P.* Somatic TP53 Mutations in the Era of Genome Sequencing // *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016. Vol. 6. № 11. P. a026179. DOI: 10.1101/cshperspect.a026179.
- Kino K., Hirao-Suzuki M., Morikawa M., Sakaga A., Miyazawa H.* Generation, repair and replication of guanine oxidation products // *Genes Environ.* 2017. Vol. 1. № 39. P. 21. DOI: 10.1186/s41021-017-0081-0.
- Kleibl Z., Kristensen V.N.* Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management // *Breast.* 2016. Vol. 28. P. 136–144. DOI: 10.1016/j.breast.2016.05.006.
- Li Y., Gordon M.W., Xu-Monette Z.Y., Visco C., Tzankov A., Zou D., Qiu L., Montes-Moreno S., Dybkaer K., Orazi A., Zu Y., Bhagat G., Richards K.L., Hsi E.D., Choi W.W., van Krieken J.H., Huang Q., Ai W., Ponzoni M., Ferreri A.J., Winter J.N., Go R.S., Piris M.A., Møller M.B., Wu L., Wang M., Ramos K.S., Medeiros L.J., Young K.H.* Single nucleotide variation in the TP53 3' untranslated region in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab-CHOP: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program // *Blood.* 2013. Vol. 121. № 22. P. 4529–4540. DOI: 10.1182/blood-2012-12-471722.
- Lichtenstein P., Holm N.V., Verkasalo P.K., Iliadou A., Kaprio J., Koskenvuo M., Pukkala E., Skytthe A., Hemminki K.* Environmental and heritable factors in the causation of cancer – analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland // *N Engl J Med.* 2000. Vol. 343. № 2. P. 78–85. DOI: 10.1056/NEJM200007133430201.
- Ming X., Matter B., Song M., Veliath E., Shanley R., Jones R., Tretyakova N.* Mapping structurally defined guanine oxidation products along DNA duplexes: influence of local sequence context and endogenous cytosine methylation // *J Am Chem Soc.* 2014. Vol. 136. № 11. P. 4223–4235. DOI: 10.1021/ja411636j.
- Moriyama H., Daino K., Ishikawa A., Imaoka T., Nishimura M., Nishimura Y., Takabatake M., Morioka T., Inoue K., Fukushi M., Shimada Y., Kakinuma S.* Exome of Radiation-induced Rat Mammary Carcinoma Shows Copy-number Losses and Mutations in Human-relevant Cancer Genes // *Anticancer Res.* 2021. Vol. 41. № 1. P. 55–70. DOI: 10.21873/anticancerres.14751.
- Mucaki E.J., Caminsky N.G., Perri A.M., Lu R., Laederach A., Halvorsen M., Knoll J.H., Rogan P.K.* A unified analytic framework for prioritization of non-coding variants of uncertain significance in heritable breast and ovarian cancer // *BMC Medical Genomics.* 2016. Vol. 9. P. 19. DOI: 10.1186/s12920-016-0178-5.
- Perriaud L., Marcel V., Sagne C., Favaudon V., Guédin A., De Rache A., Guetta C., Hamon F., Teulade-Fichou M.P., Hainaut P., Mergny J.L., Hall J.* Impact of G-quadruplex structures and intronic polymorphisms rs17878362 and rs1642785 on basal and ionizing radiation-induced expression of alternative p53 transcripts // *Carcinogenesis.* 2014. Vol. 35. № 12. P. 2706–2715. DOI: 10.1093/carcin/bgu206.
- Preston D.L., Ron E., Tokuoka S., Funamoto S., Nishi N., Soda M., Mabuchi K., Kodama K.* Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958–1998 // *Radiat Res.* 2007. Vol. 168. № 1. P. 1–64. DOI: 10.1667/RR0763.1.
- Preston D.L., Kitahara C.M., Freedman D.M., Sigurdson A.J., Simon S.L., Little M.P., Cahoon E.K., Rajaraman P., Miller J.S., Alexander B.H., Doo- dy M.M., Linet M.S.* Breast cancer risk and protracted low-to-moderate dose occupational radiation exposure in the US Radiologic Technologists Cohort, 1983–2008 // *Br J Cancer.* 2016. Vol. 115. № 9. P. 1105–1112. DOI: 10.1038/bjc.2016.292.
- Ripperger T., Gadzicki D., Meindl A., Schlegelberger B.* Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling // *Eur J Hum Genet.* 2009. Vol. 17. № 6. P. 722–731. DOI: 10.1038/ejhg.2008.212.
- Rodin S.N., Rodin A.S.* On the excess of G → T transversions in the p53 gene in lung cancer cell lines. Reply to Pfeifer and Hainaut // *Mutat Res.* 2004. Vol. 545. № 1–2. P. 141–144. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2003.09.008.
- Steenken S., Jovanovic S.V.* How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution // *J Am Chem Soc.* 1997. Vol. 119. P. 617–618. DOI: 10.1021/ja962255b.
- Szpechcinski A., Szolkowska M., Winiarski S., Lechowicz U., Wisniewski P., Knetki-Wroblewska M.* Targeted Next-Generation Sequencing of Thymic Epithelial Tumours Revealed Pathogenic Variants in KIT, ERBB2, KRAS, and TP53 in 30% of Thymic Carcinomas // *Cancers.* 2022. Vol. 14. № 14. P. 3388. DOI: 10.3390/cancers14143388.
- United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR). Effects of Ionizing Radiation. UNSCEAR2006 Report to the General Assembly, with scientific annexes United Nations: New York.

**Analysis of G:C>T:A, G:C>A:T and G:C>C:G mutations  
in the TP53 gene in women with and without breast cancer  
in the long term period after chronic radiation exposure**

**V. S. Nikiforov<sup>1, 2, #</sup>, A. V. Korechenkova<sup>1</sup>, A. V. Akleyev<sup>1, 2</sup>**

<sup>1</sup>Urals Research Center for Radiation Medicine, URCRM, 68-A Vorovsky Street, Chelyabinsk, 454141 Russia

<sup>2</sup>Chelyabinsk State University, 129, Bratev Kashirinykh Street, Chelyabinsk, 454001 Russia

<sup>#</sup>E-mail: nikiforovx@mail.ru

This paper presents the results of the analysis of mutations such as G:C>T:A, G:C>A:T and G:C>C:G in the TP53 gene in peripheral blood cells in women affected by chronic radiation exposure with breast cancer (24 persons) and without breast cancer (17 persons). 17 different variants representing single nucleotide substitutions were registered. The differences in the frequencies of carriers of the detected variants between the comparison and the main group were not statistically significant. All detected variants were present in the IARC TP53 database and had no clinical significance as “pathogenic.” Despite the absence of statistically significant differences, the question of the effect of chronic low dose rate exposure on the frequency of mutations in the TP53 gene remains open and requires further research involving a greater amount of data.

*Keywords:* TP53, Sanger sequencing, the Techa River, chronic radiation exposure low and medium doses, transversion

УДК 574.21:574.52:574.632

## РАСПРОСТРАНЕНИЕ *LEMNA* НА ГРАНИЦЕ АРЕАЛА НА СЕВЕРО-ЗАПАДЕ МУРМАНСКОЙ ОБЛАСТИ КАК РЕЗУЛЬТАТ АНТРОПОГЕННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ

© 2024 г. Н. В. Зуева\*<sup>®</sup>, О. Г. Гришуткин\*\*<sup>®</sup>, Д. Ю. Ефимов\*\*<sup>®</sup>, А. А. Бобров\*\*<sup>®</sup>

\*Российский государственный гидрометеорологический университет

ул. Воронежская, 79, Санкт-Петербург, 192007, Россия

\*\*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанова РАН

пос. Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл., 152742, Россия

<sup>®</sup>e-mail: nady.zuyeva@ya.ru

<sup>®</sup>e-mail: lsd@ibiw.yaroslavl.ru

Поступила в редакцию: 26.02.2024 г.

После доработки 11.06.2024 г.

Принята к публикации 14.06.2024 г.

Приведены данные о новых местонахождениях рясок *Lemna minor*, *Lemna trisulca* и *Lemna* × *japonica* – гибрида между *L. minor* и *L. turionifera* (Lemnaceae) на северо-западе Мурманской области севернее 68.5° с. ш., в том числе в государственном природном заповеднике “Пасвик” и на сопредельных ему территориях в водосборном бассейне р. Паз. На северо-западе Мурманской области обнаружено 2 новых местонахождения *L. minor*, 1 – *L. × japonica*, а также 10 новых местонахождений *L. trisulca*. Всего представители рода *Lemna* произрастали на 18 обследованных станциях: 2 – *L. minor*, 2 – *L. × japonica*, 16 – *L. trisulca* (на 2 станциях *L. minor* и *L. trisulca* произрастали совместно). Диапазон рН воды исследованных рек и озер изменялся от 6.0 до 7.6, т.е. был преимущественно нейтральным (среднее значение – 6.9). Минерализация воды изменялась от 17 до 251 мг/л (среднее значение – 53 мг/л). Местонахождения *L. minor* в безымянном озере у г. Заполярный и оз. Куэтсьярви – по-видимому, самые северные в мире, а *L. trisulca* в р. Паз (оз. Клистерватн) – в европейской России. На севере Мурманской области *L. minor* и *L. × japonica* связаны только с антропогенно эвтрофированными водоемами с повышенной, относительно фона, минерализацией воды. Данные таксоны можно считать здесь индикаторами высокой трофности. Местообитания *L. trisulca* – преимущественно антропогенно трансформированные водные объекты. Максимальные показатели обилия данного вида отмечены также в зонах повышения трофности водоема.

**Ключевые слова:** водные растения, загрязнение, Кольский Север, оз. Куэтсьярви, р. Паз, ряска, Субарктика, Фенноскандия, эвтрофирование, *Lemna minor*, *Lemna trisulca*, *Lemna* × *japonica*

**DOI:** 10.31857/S1026347024060055, **EDN:** uktrjsh

Подробные исследования растительного покрова водных объектов севера Мурманской области, особенно заповедника “Пасвик” и его окрестностей, проводятся нами с 2019 г. За этот период обнаружены новые местонахождения некоторых редких или интересных видов водных макрофитов (Зуева и др., 2022а, б), в том числе расширены представления о распространении видов *Lemna* на севере европейской части России.

*Lemna minor* L. и *Lemna trisulca* L. имеют широкий географический ареал. Оба вида связаны с мезотрофными водными объектами, а *L. minor* – также с эвтрофными (Landolt, 1992).

*L. minor* и *L. trisulca* известны в Мурманской области из весьма небольшого числа

местонахождений, которые для *L. minor* описаны в работе Н. П. Кирилловой (2014). Для *L. trisulca* характеристика встречаемости в заповеднике “Пасвик” и его окрестностях дана в монографии А. В. Кравченко (2020), также приводятся местонахождения вида в Мурманской области. Ряд публикаций содержит сведения об отдельных находках представителей *Lemna* в регионе (Раменская, Андреева, 1982; Moiseenko *et al.*, 1994; Кравченко и др., 2017; Разумовская, Петрова, 2017; Боровичев и др., 2020 и др.). Для *L. × japonica* – гибрида *L. minor* и *L. turionifera* нет подробных сведений о распространении в Мурманской области. Возможная причина этого состоит в сложности идентификации по морфологическим признакам растений

данного таксона (Landolt, 1975; Volkova *et al.*, 2023). Единственный образец *L. × japonica* из г. Мурманска цитируется в работе П. А. Волковой с соавт. (Volkova *et al.*, 2023).

Помимо опубликованных данных, некоторые сведения о видах рясок содержатся в общедоступных базах данных: [www.inaturalist.org](http://www.inaturalist.org) и [www.gbif.org](http://www.gbif.org).

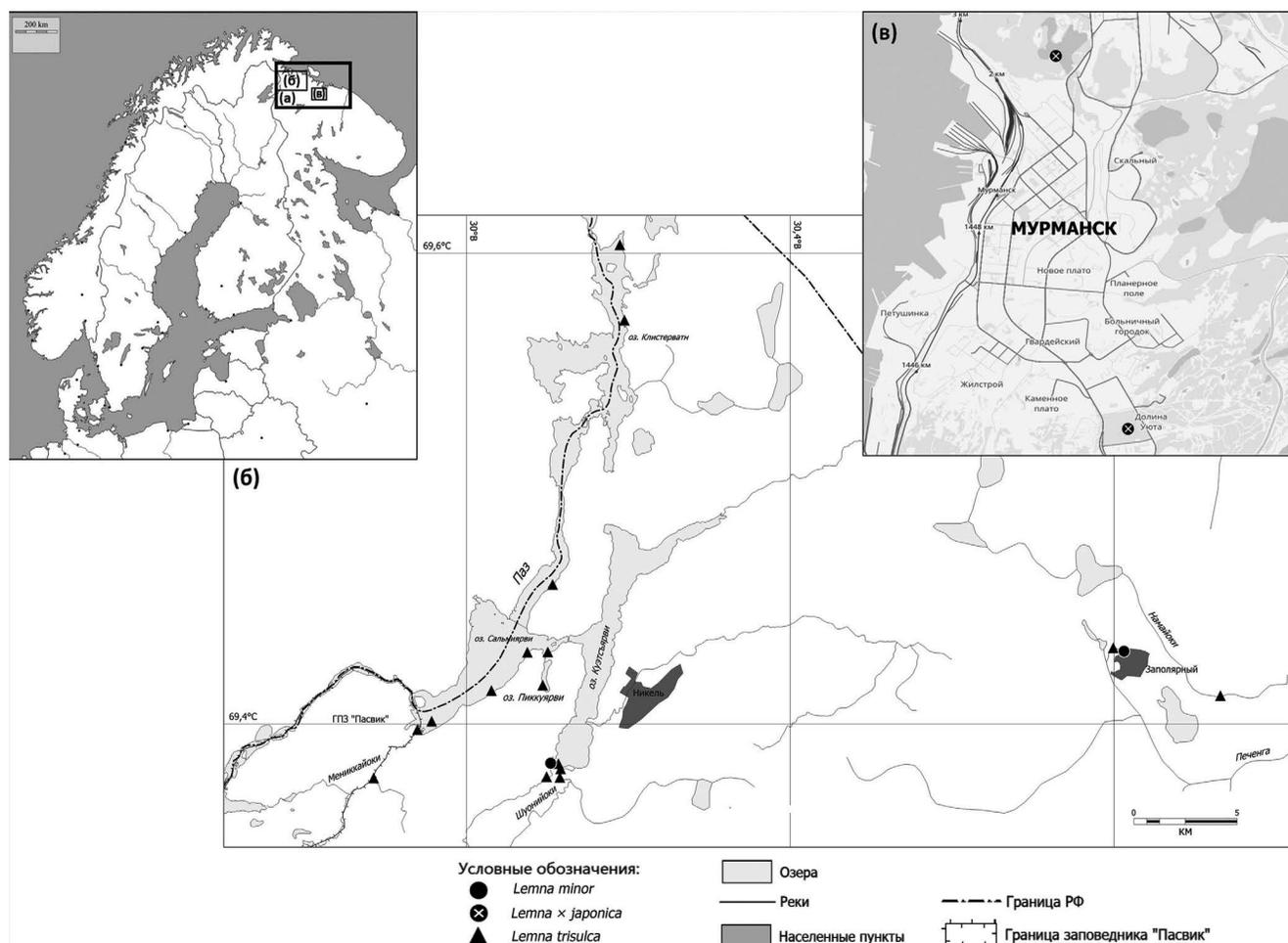
Происходящие в регионе антропогенные изменения водных объектов: загрязнение, усиление процессов эвтрофирования — наряду с потеплением климата открывают возможности для расширения распространения *Lemna*. Эти растения легко расселяются водоплавающими птицами и при благоприятных для них условиях среды обитания могут закрепляться в новых местообитаниях, в том числе и на границе ареала (Landolt, 1986).

Цель работы: определить северные границы распространения *Lemna* на Северо-Западе Европейской России и причины, способствующие существованию краевых популяций.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В августе–сентябре 2019–2023 гг. в Мурманской области авторами было обследовано 402 участка (станции) рек и озер севернее 68.5° с. ш. (рис. 1а). Они расположены в зоне северной тайги (долина р. Паз), лесотундровой и тундровой зонах. Административно изученные водоемы находятся в Печенгском и Кольском р-нах, а также в г. Мурманске.

При выполнении полевых работ использованы традиционные методические подходы (Катанская, 1981; Бобров, Чемерис, 2006). Описание растительного покрова выполнялось на участке вдоль берега водоема или русла реки протяженностью около 500 м, небольшие заливы описывались полностью. Укосы для определения фитомассы производились с площади 1 м<sup>2</sup>. Цитируемые в данной работе образцы переданы в гербарий Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанова РАН (IBIW).



**Рис. 1.** Местонахождения *Lemna minor*, *L. × japonica* и *L. trisulca* в 2019–2023 гг. на северо-западе Мурманской области. а – район исследований; б – местонахождения *Lemna* в бассейнах рек Паз и Печенга; в – местонахождения *Lemna* в г. Мурманск.

Идентификация растений *L. minor* и *L. × japonica* подтверждена молекулярно-генетически – исследован интрон гена β-тубулина (TUBB2) (Volkova *et al.*, 2023).

Значения общей минерализации воды и pH определены при проведении полевых работ портативным анализатором Hanna HI98129. Недостающие данные о pH воды в оз. Семёновское дополнены литературными сведениями (Даувальтер и др., 2021).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

За 5 полевых сезонов были обнаружены: 2 местонахождения *L. minor*, 2 – *L. × japonica* и 16 – *L. trisulca* (рис. 1б, в; табл. 1, 2).

Растения *L. minor* найдены в оз. Куэтсьярви (водосбор р. Паз), безымянном озере в г. Заполярном (водосбор р. Печенга) (рис. 1б; табл. 1). Гибрид *L. × japonica* обнаружен в двух озерах г. Мурманска: оз. Семёновское и оз. Варничное (рис. 1в; табл. 1).

*L. trisulca* обнаружен в р. Паз на 7 станциях, расположенных ниже заповедника “Пасвик” (рис. 1б; табл. 2, № 1–7). В бассейне р. Паз *L. trisulca* найден на 7 станциях (табл. 2; № 8–14): в р. Мениккайоки в заповеднике “Пасвик”; в оз. Куэтсьярви и двух его притоках – р. Шуонийоки и безымянной реке; а также в оз. Пикуярви. Кроме того, *L. trisulca* отмечен в соседнем с водосбором р. Паз бассейне р. Печенга на двух станциях: в р. Намайоки и безымянном озере в г. Заполярный (табл. 2; № 15–16).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Все находки растений сделаны в северной тайге и лесотундре, в тундре представители *Lemna* не были обнаружены. *L. minor* и *L. × japonica* не отмечены для водотоков, встречены лишь в озерах. Приведенные в статье Н. Р. Кирилловой (2014) местообитания *L. minor* на севере Мурманской области – также озера, хотя на юге региона приведены данные о находках в реках. *L. trisulca* был обнаружен и в озерах, и в реках (в местах замедленного течения). Диапазон pH водных объектов, в которых встречаются виды *Lemna*, составляет 6.0–7.4, т.е. слабнокислый–нейтральный, в целом типичный для региона (Кашулин и др., 2009). Минерализация воды в обнаруженных местообитаниях рясок изменялась от 17 до 251 мг/л, причем *L. minor* и *L. × japonica* не отмечены в водах со значениями этого показателя менее 44 мг/л и 73 мг/л соответственно. Учитывая, что фоновые величины минерализации воды в регионе 20–30 мг/л (Даувальтер и др., 2021), видно, что *L. minor* и *L. × japonica* тяготеют к местам с повышенной минерализацией. В то же время было отмечено, что *L. trisulca* мог достигать высокого обилия при очень низких значениях минерализации воды – около 17–18 мг/л.

### *Lemna minor*

Ближайшие находки *L. minor* на севере Мурманской области указаны в работе Кирилловой (2014): парк в г. Североморск, оз. Семёновское

**Таблица 1.** Описание местонахождений *Lemna minor* и *L. × japonica* на северо-западе Мурманской области

№	Местонахождение	Координаты, ° с. ш., ° в. д.	pH	TDS, мг/л	Особенности
<i>Lemna minor</i>					
1*	Мурманская обл., Печенгский р-н, 4 км к ю.-з. от пгт. Никель, южная часть оз. Куэтсьярви, зарастающее мелководье. 20.07.2022. ЗН, ГО	69.382841 30.105961	6.7	44	С небольшим обилием в сообществе <i>Equisetum fluviatile</i> L. на площади в несколько сотен м <sup>2</sup>
2*	Там же, г. Заполярный, безымянное озеро. 13.08.2023. ЗН, ГО	69.431265 30.804221	6.4	150	Массовое развитие на мелководьях в сообществе <i>Comarum palustre</i> L. в западной части озера. Вода характеризуется очень сильным гнилостным запахом
<i>Lemna × japonica</i>					
1	г. Мурманск, оз. Семёновское. 09.08.2021. ЗН, ГО	68.991150 33.083803	6.8	73	С малым обилием в прибрежных зарослях гелофитов.
2*	Там же, оз. Варничное. 09.08.2023. ЗН, ГО	68.941659 33.110683	6.2	251	Малое обилие в плотных прибрежных зарослях заболоченного берега (сообщества с <i>Carex</i> spp.)

Примечание. \* – новые местонахождения; TDS – общая минерализация воды; ЗН – Н.В. Зуева, ГО – О.Г. Гришуткин.

Таблица 2. Описание местонахождений *Lemna trisulca* на северо-западе Мурманской области

№	Местонахождение	Координаты, ° с. ш., ° в. д.	pH	TDS, мг/л	Особенности
1	Мурманская обл., Печенгский р-н, р. Паз, оз. Сальмиярви, рядом с устьем р. Мениккайоки. 19.09.2019. ЗН, ГО. 06.08.2020. ЗН, ГО	69.398432 29.947463	7.6	35	На мелководье с незначительным обилием
2	Там же, рядом с пирсом. 06.08.2020. ЗН, ГО, ЕД	69.413553 30.031166	—	17	На мелководье, 0–50 см, в поясе воздушно-водных растений находится в массе, местами образует слой ~10 см на дне
3	Там же, выше протоки в оз. Куэтсьярви. 06.08.2020. ЗН, ГО, ЕД	69.429936 30.075528	7.4	18	С высоким обилием в поясе воздушно-водных растений на мелководье
4	Там же, залив, соединяющийся протокой с оз. Куэтсьярви. 22.07.2021. ЗН, ГО	69.429310 30.096633	7.4	46	С небольшим обилием во внутреннем заросшем заливе с торфяно-илистым грунтом
5*	Там же, в 2 км ниже оз. Сальмиярви. В мелководной илистой заводи, отделенной от основной акватории полосой воздушно-водных растений. 18.09.2020. ЗН, ГО, ЕД	69.458762 30.106363	6.4	35	С малым обилием
6*	Там же, оз. Клистерватн. 22.07.2021. ЗН, ГО	69.602166 30.190209	7.3	19	У берега в полосе гелофитов встречается с малым обилием
7*	Там же, в небольшом заболоченном заливе между берегом и островом. 22.07.2021. ЗН, ГО	69.571251 30.195577	7.2	20	Единичные экземпляры
8	Там же, р. Мениккайоки. 31.07.2020. ЗН, ГО, ЕД	69.376170 29.885048	7.1	40	Незначительное обилие
9*	Там же, р. Мениккайоки, устьевая зона, заросший рукав реки. 31.07.2020. ЗН, ГО, ЕД	69.397109 29.939810	7.6	43	На дне, в месте с очень слабым течением, обилие невелико
10	Там же, 4 км к ю.-з. от пгт. Никель, южная часть оз. Куэтсьярви, зарастающее мелководье. 20.07.2022. ЗН, ГО	69.382841 30.105961	6.7	44	В сообществе <i>Equisetum fluviatile</i> L. совместно с <i>L. minor</i> , с незначительным обилием
11*	Там же, р. Шуонийоки, нижнее течение. 01.08.2020. ЗН, ГО, ЕД	69.377747 30.114250	7.0	41	С незначительным обилием
12*	Там же, затон р. Шуонийоки. 19.07.2022. ЗН, ГО	69.376075 30.115994	6.0	20	С незначительным обилием
13*	Там же, безымянная река – южный приток оз. Куэтсьярви. 24.07.2021. ЗН, ГО	69.376893 30.102881	6.4	33	С незначительным обилием
14*	Там же, 4 км к з. от пгт. Никель оз. Пикуярви. 04.08.2021. ЗН, ГО	69.414977 30.095144	7.3	45	С незначительным обилием
15*	Там же, 4 км к ю.-в. от г. Заполярный, р. Намайоки. 05.08.2022. ЗН, ГО	69.411526 30.931794	6.5	23	С незначительным обилием
16*	Там же, г. Заполярный, безымянное озеро. 13.08.2023. ЗН, ГО	69.431265 30.80421	6.4	150	Отдельные растения на мелководье среди массово встречающегося <i>L. minor</i> . Вода с очень сильным гнилостным запахом

Примечание. \* – Новые местонахождения; TDS – общая минерализация воды; “—” – отсутствие данных; ЗН – Н.В. Зуева, ГО – О.Г. Гришуткин, ЕД – Д.Ю. Ефимов.

в г. Мурманск и с. Минькино на западном берегу Кольского залива. В базах данных iNaturalist и GBIF есть указание *L. minor* в пос. Росляково, севернее г. Мурманска (<https://www.inaturalist.org/observations/135498818>).

Известный, по устному сообщению Сортланда 2010 г., *L. minor* в оз. Семёновское (Кириллова, 2014) оказался морфологически близким его гибридом с *L. turionifera* (*L. × japonica*), который здесь был собран в 2021 г. авторами и идентифицирован П.А. Волковой с соавт. (Volkova *et al.*, 2023).

По данным базы GBIF, севернее 68.5° с. ш. во всем мире отмечено лишь 4 наблюдения *L. minor*, в том числе два уже упомянутых выше – в окрестностях г. Мурманска (GBIF..., 2023a). В одном из них, в оз. Семёновское, авторами обнаружен не *L. minor*, а *L. × japonica*. Третье наблюдение – в Якутии на широте 70.8°. Последнее указание ошибочно и относится к *L. turionifera* (Бобров, Мочалова, 2014). Четвертая, самая северная находка *L. minor*, согласно данным GBIF, сделана в Гренландии на 74° с. ш. Данное указание ошибочно, так как из этикетки (<https://www.gbif.org/occurrence/1455165536>) отмеченного образца (MTMG 100896) следует, что он собран в Канаде, в провинции Квебек. При указании точки сбора перепутаны значения широты и долготы.

Обнаруженные авторами местонахождения *L. minor* в оз. Куэтсьярви (система р. Паз) и в безымянном озере в г. Заполярный (бассейн р. Печенга), оказались самыми северными в Евразии, а возможно и в мире.

### *L. × japonica*

Первая находка *L. × japonica* в Мурманской области идентифицирована П.А. Волковой с соавт. (Volkova *et al.*, 2023) по собранному нами образцу из оз. Семёновское (г. Мурманск). При этом известно, что *L. × japonica* довольно широко распространён в разных регионах европейской России (Volkova *et al.*, 2023). Таксон отмечается в Северной Европе: Швеции, Норвегии, Великобритании (Vog *et al.*, 2020; GBIF..., 2023b). Таким образом, его присутствие на севере Европейской части России вполне закономерно.

#### **Характеристика водных объектов – местонахождений *L. minor* и *L. × japonica***

Все озера, в которых обнаружены *L. minor* (Куэтсьярви и безымянное озеро в г. Заполярный) и *L. × japonica* (Семёновское, Варничное), испытывают значительное антропогенное воздействие и в них идут процессы эвтрофирования. Кроме того, в водоемах отмечено увеличение в несколько раз минерализации воды, фоновое значение которой в водных объектах Кольского севера не превышает

20–30 мг/л (Даувальтер и др., 2021). Причина этого – повышение поступления солей в реки и озера в результате активной хозяйственной деятельности на их водосборах (Даувальтер и др., 2021).

Так, оз. Семёновское, расположенное в г. Мурманске, по содержанию общего фосфора и соотношению общего азота к общему фосфору может характеризоваться как эвтрофное (Slukovskii *et al.*, 2020). В этом водоеме зафиксированы экстремально высокие для арктической зоны показатели фотосинтетической активности фитопланктона. В массе развиваются устойчивые к загрязнению его представители, предпочитающие эвтрофные воды (Денисов и др., 2020). Минерализация воды озера примерно в 2–3 раза выше фоновой.

Оз. Варничное – проточный водоем на руч. Варничном. Этот ручей – наиболее загрязненный водоток г. Мурманск, его вода характеризуется очень низким качеством (“экстремально грязная”) (Качество..., 2023). В ручье зафиксирован дефицит содержания растворенного кислорода. Среди химических веществ, по которым отмечались критические уровни загрязненности воды: аммонийный азот и фосфор фосфатов – биогенные соединения, приводящие к эвтрофированию (Качество..., 2023). В этом водоеме отмечена самая высокая минерализация, в 10 раз превосходящая фоновую.

Безымянное озеро в г. Заполярный находится в городской черте. Специальных публикаций о его экологическом состоянии нет. В период проведения исследований органолептические характеристики воды позволили сделать предположение о поступлении в этот водоем недоочистенных коммунально-бытовых сточных вод. Был зафиксирован очень сильный гнилостный запах воды, усиливающийся от западной части озера к восточной. Минерализация воды была примерно в 5 раз выше фоновой. Эвтрофное состояние озера также косвенно подтверждается обильным развитием *Lemna*.

Оз. Куэтсьярви – водоем, сообщающийся протокой с р. Паз, загрязняемый стоками горно-металлургического комбината “Печенганикель” и пос. Никель. По такой гидрохимической характеристике, как содержание общего фосфора, разные районы озера характеризуются уровнем трофности в диапазоне от олиготрофного до мезотрофного (Сандимиров, 2012). Отмечается накопление фосфора в поверхностных слоях донных отложений (Даувальтер, Кашулин, 2018). В работе Д.Б. Денисова с соавт. (2020) указано, что, несмотря на антропогенное эвтрофирование, озеро по характеристикам фитопланктона сохраняет некоторые черты олиготрофных водоемов в отдельных участках его акватории из-за ингибирования фотосинтетических процессов токсическими компонентами (соединениями тяжелых металлов) и наличия водообменных процессов. Согласно материалам о состоянии

зоопланктонных сообществ (Зубова и др., 2019), трофический статус оз. Куэтсьярви повысился в многолетнем ряду исследований от очень низкого  $\alpha$ -олиготрофного до среднего  $\beta$ -мезотрофного. А по данным о состоянии бентосных сообществ сделан вывод об усилении процессов эвтрофирования (Зубова и др., 2019). Минерализация воды в озере выше фоновой. Как указывает С. С. Сандимиров (2012), она возросла из-за сбросов горно-металлургического комбината. Отметим, что при исследованиях флоры оз. Куэтсьярви в 1993 г. (Moiseenko *et al.*, 1994) *L. minor* не был обнаружен, был отмечен только *L. trisulca*.

В работе Н. Р. Кирилловой (2014) также отмечается, что на севере Мурманской области *L. minor* встречается в антропогенно эвтрофированных водоемах. Таким образом, *L. minor* и *L. × japonica* можно считать здесь индикаторами повышения тропности водоемов.

Можно предположить, что в дальнейшем как *L. minor*, так и *L. × japonica* могут быть отмечены в большинстве загрязняемых биогенными соединениями водоемов севера Мурманской области. Именно к таким относятся все описанные в данной статье озера. Учитывая, что в естественных условиях трофическое состояние озер на Кольском Севере носит олиготрофный и даже ультраолиготрофный характер (Румянцев и др., 2015), можно сделать вывод о том, что антропогенная нагрузка на водные экосистемы благоприятствовала распространению этих видов ряски в регионе.

### *Lemna trisulca*

На детально исследованной во флористическом отношении территории заповедника “Пасвик” *L. trisulca* встречается очень редко — указывается для среднего течения р. Мениккайоки (Кравченко, 2020). Одна из двух находок в заповеднике сделана авторами в том же месте, спустя 5 лет после 2015 г. (Кравченко и др., 2017). Вторая находка сделана в нижнем течении р. Мениккайоки, в приустьевой зоне с практически стоячей водой и развитыми зарослями гелофитов.

Оз. Сальмиярви — второй район, где *L. trisulca* был известен как в российской части системы р. Паз (Боровичев и др., 2020), так и в норвежской, где он отмечается с 1985 г. (Moiseenko *et al.*, 1994; GBIF..., 2023c). Именно в это озеро впадает р. Мениккайоки и неудивительно, что находки *L. trisulca* сделаны авторами в заливе озера, где расположено устье этой реки.

Ниже устья р. Мениккайоки по течению р. Паз *L. trisulca* обнаружен на всех четырех исследованных станциях оз. Сальмиярви. Причем на двух из них его обилие велико, особенно в районе пирса в средней части юго-восточного берега озера. На этой станции сформирован широкий пояс

воздушно-водных растений, в котором на мелководье *L. trisulca* встречается в массе — образует толстый подводный ковер на дне. Его фитомасса в таких местах достигала 947 г/м<sup>2</sup> (сухая масса 98 г/м<sup>2</sup>). Такие значения очень высоки и свидетельствуют о благоприятных условиях для развития данного растения в озере: наличие участков с замедленным течением воды и развитыми сообществами воздушно-водных макрофитов, где *L. trisulca* находит укрытие. Ранее для норвежской акватории р. Паз в оз. Сальмиярви описано очень обильное развитие *L. trisulca*, покрывающего большую часть поверхности залива у пос. Сванвик (Moiseenko *et al.*, 1994).

Остальные 3 находки в р. Паз сделаны ниже оз. Сальмиярви. Таким образом, можно утверждать, что *L. trisulca* распространен на всем течении реки от оз. Сальмиярви до оз. Клистерватн (перед Борисоглебской ГЭС), хоть и с малым обилием.

### *Характеристика водных объектов — местонахождений L. trisulca*

Ряд водных объектов, в которых обнаружен *L. trisulca*, в большей или меньшей степени антропогенно трансформирован. Так, р. Паз представляет собой озерно-речную систему, которая зарегулирована 7 гидроэлектростанциями. В зонах озерводохранилищ снижаются скорости течения воды и создаются условия, благоприятные для развития *L. trisulca*. Водосборная территория реки подвергается заметному антропогенному воздействию. Значительная техногенная нагрузка на территорию создается комбинатом “Печенганикель”. Река принимает промышленные и коммунальные стоки (Moiseenko *et al.*, 1994, Сандимиров, 2012).

Местонахождения *L. trisulca* сильнее всего сконцентрированы в системе связанных водных объектов в окрестностях г. Никель: оз. Сальмиярви (р. Паз) — оз. Пикуярви — оз. Куэтсьярви и его притоки.

В оз. Сальмиярви зафиксировано самое обильное развитие *L. trisulca*. Высокое обилие растения должно поддерживаться за счет повышенного содержания биогенных соединений в воде, так как представители *Lemna* избегают олиготрофных условий (Landolt, 1986). Поступление биогенов возможно вследствие активной антропогенной деятельности на берегах р. Паз в районе озера как на российской, так и на норвежской части водосбора. Высокие продукционные показатели *L. trisulca* могут являться индикатором происходящих процессов эвтрофирования этого озера.

Ниже по течению р. Паз, до оз. Клистерватн (перед Борисоглебской ГЭС), обилия *L. trisulca* на станциях мало. Популяция растения здесь может пополняться за счет обильных зарослей в оз. Сальмиярви.

Р. Мениккайоки — также часть водной системы р. Паз. Ранее была рукавом этого водотока, но при создании ГЭС отделена плотиной от основной реки. Теперь представляет собой приток р. Паз, впадающий в оз. Сальмиярви. Р. Мениккайоки характеризуется повышенными значениями общей минерализации воды вследствие естественных причин — геологического строения ее водосбора. Приток воды этой реки локально увеличивает минерализацию и в р. Паз — в оз. Сальмиярви.

Анализируя карту распространения *L. trisulca* (рис. 1) может создаться впечатление, что популяция вида в р. Мениккайоки поддерживает популяцию в р. Паз. Однако это не обязательно так, поскольку р. Мениккайоки зарегулирована оз. Сальмиярви, уровень которого, в свою очередь, зависит от работы плотины гидроэлектростанции. При повышении уровня озера происходит заток воды в р. Мениккайоки. Такая ситуация была зафиксирована дважды в разные полевые сезоны.

Оз. Куэтсьярви уже описано выше как загрязняемый и эвтрофируемый водоем. В водах его двух притоков *L. trisulca* встречен в их низовьях (рис. 1) в том числе в местообитаниях, где не зафиксированы прямые антропогенные нарушения, с фоновыми значениями минерализации и рН.

Также *L. trisulca* дважды встречен в водных объектах бассейне р. Печенга, а именно в р. Намайоки, качество воды которой характеризуется как “грязная” (Качество..., 2023). Она принимает хозяйственно-бытовые сточные воды, а в период весеннего половодья и дождей паводков в нее с поверхностным стоком поступают загрязненные воды с хвостохранилища обогащательной фабрики комбината “Печенганикель” (Качество..., 2011). Второе место — безымянное озеро в г. Заполярный было уже выше описано как загрязненное недоочищенными сточными водами.

Таким образом, *L. trisulca* встречается в водных объектах исследованного района как при фоновых значениях абиотических характеристик, так и при их антропогенном изменении. Хозяйственная деятельность человека создает условия для его обильного развития в некоторых водоемах, откуда *L. trisulca* может расселяться по региону.

Местонахождение *L. trisulca* в р. Паз в оз. Клистерватн — по-видимому, самое северное в европейской части России. На соседней территории Норвегии растение встречается севернее 70° с. ш. (GBIF..., 2023с). В азиатской части Российской Федерации известны местонахождения этого вида севернее 69° с. ш. на Ямале, в Якутии и на Таймыре (GBIF..., 2023с). На Таймыре *L. trisulca* встречается до 72.6° с. ш. (<https://www.inaturalist.org/observations/38848851>), во флоре Таймырского заповедника вид находится на северном пределе своего ареала, но в небольшом отрыве от основной части (Поспелова, 2001).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На северо-западе Мурманской области обнаружено 2 новых местонахождения *Lemna minor*, 1 — *L. × japonica* и 10 — *L. trisulca*. Всего обнаружено 18 участков рек и озер (станций), на которых встречаются эти растения: 2 — для *L. minor*, 2 — *L. × japonica* и 16 — *L. trisulca*. На двух станциях *L. trisulca* и *L. minor* отмечены вместе, причем из них всегда преобладал *L. minor*. На одной из станций (оз. Семеновское) вместо ранее указанного *L. minor* идентифицирован его гибрид *L. × japonica*.

Обнаруженные впервые местонахождения *L. minor* в безымянном озере в г. Заполярный (водосбор р. Печенга) и оз. Куэтсьярви (водосбор р. Паз) — одни из самых северных в мире, а местонахождение *L. trisulca* в р. Паз в оз. Клистерватн — самое северное в Европейской России.

Изученные водные объекты характеризовались значениями рН от 6.0 до 7.6, находились в основном в нейтральном диапазоне кислотности (среднее значение — 6.9). Минерализация воды находилась в пределах от 17 до 251 мг/л, однако преимущественно до 46 мг/л. Все находки *L. minor* и *L. × japonica* сделаны в водоемах с повышенной, относительно фона, минерализацией воды: 44 и 150 мг/л для *L. minor*, 73 и 251 мг/л для *L. × japonica*.

Массовое развитие *L. trisulca* наблюдалось в преимущественно антропогенно трансформированных водных объектах. Максимальные показатели обилия данного вида зафиксированы в зонах повышения трофности.

Все описанные находки *L. minor* и *L. × japonica* на севере Мурманской области связаны только с антропогенно эвтрофируемыми водоемами. Данные таксоны можно считать здесь индикаторами высокой трофности.

Хозяйственная деятельность человека и связанное с ней поступление биогенных соединений в водные экосистемы приводят к увеличению подходящих для видов рода *Lemna* местообитаний с повышенной трофностью и минерализацией. При проведении целенаправленных исследований флоры загрязненных водоемов Кольского Севера можно ожидать увеличения числа находок *Lemna* в реках и озерах этого региона.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-14-00115, Бобров, Гришуткин, Ефимов, анализ распространения и экологических закономерностей) и в рамках госзадания ИБВВ РАН (тема № 124032100076-2, Бобров, Гришуткин, Ефимов, использование лабораторного оборудования).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны П.А. Волковой (ИБВВ РАН) за молекулярно-генетическое подтверждение определений *L. minor* и *L. × japonica*, Н.В. Поликарповой, Г.А. Дмитренко, И.Д. Дорошу и Ю.М. Бычкову (государственный заповедник “Пасвик”) за организационную и информационную поддержку при полевых работах на территории заповедника и в его окрестностях.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## БИОЭТИКА

Эта работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бобров А.А., Мочалова О.А.* Заметки о водных сосудистых растениях Якутии по материалам якутских гербариев // *Новости сист. высших раст.* 2014. Т. 45. С. 122–144.
- Бобров А.А., Чемерис Е.В.* Изучение растительного покрова ручьев и рек: методика, приемы, сложности // В кн.: *Гидробиотаника 2005: матер. VI Всерос. школы-конф.* (пос. Борок, 11–16 окт. 2005 г.). Рыбинск. 2006. С. 181–203.
- Боровичев Е.А., Кожин М.Н., Игнашов П.А., Кириллова Н.Р., Копеина Е.И., Кравченко А.В., Кузнецов О.Л., Кутенков С.А., Мелехин А.В., Попова К.Б., Разумовская А.В., Сенников А.Н., Фадеева М.А., Химич Ю.Р.* Значимые находки растений, лишайников и грибов на территории Мурманской области. II // *Труды Карельского научного центра РАН.* 2020. № 1. С. 17–33.  
<https://doi.org/10.17076/bg1078>
- Даувальтер В.А., Кашулин Н.А.* Оценка экологического состояния Арктической пресноводной системы по результатам исследований содержания тяжелых металлов в донных отложениях // *Геохимия.* 2018. № 8. С. 805–819.  
<https://doi.org/10.1134/S0016752518080034>
- Даувальтер В.А., Слуковский З.И., Денисов Д.Б., Черепанов А.А.* Особенности химического состава городских озер Мурманска // *Вестн. СПбГУ. Науки о Земле.* 2021. 66(2). С. 252–266.  
<https://doi.org/10.21638/spbu07.2021.204>
- Денисов Д.Б., Слуковский З.И., Косова А.Л.* Содержание хлорофилла “а” в планктоне озер урбанизированных территорий Мурманской области // *Труды Ферсмановской научной сессии ГИ КНЦ РАН.* 2020. № 17. С. 163–167.  
<https://doi.org/10.31241/FNS.2020.17.030>
- Зубова Е.М., Кашулин Н.А., Даувальтер В.А., Денисов Д.Б., Валькова С.А., Вандыш О.И., Терентьев П.М., Черепанов А.А.* Долговременная динамика основных компонентов экосистемы озера Куэтсьярви (система реки Пасвик, Мурманская область) // *Биосфера.* 2019. Т. 11. № 4. С. 178–200.  
<https://doi.org/10.24855/biosfera.v11i4.513>
- Зуева Н.В., Гришуткин О.Г., Зуев Ю.А., Ефимов Д.Ю., Чемерис Е.В., Бобров А.А.* Оценка состояния растительного покрова трансграничного водотока северной Фенноскандии (российская часть р. Паз) // *Биология внутренних вод.* 2022а. № 4. С. 381–394.  
<https://doi.org/10.31857/S0320965222040325>
- Зуева Н.В., Гришуткин О.Г., Ефимов Д.Ю., Бобров А.А.* Штуkenия нитевидная (*Stuckenia filiformis* (Pers.) B rner) в заповеднике “Пасвик” и на сопредельных территориях: лимитирование распространения минерализацией воды // *Труды Карельского научного центра РАН.* 2022б. № 1. С. 83–88.  
<https://doi.org/10.17076/bg1517>
- Качество поверхностных вод Российской Федерации: Ежегодник 2010. Ростов-на-Дону. 2011. 571 с.  
<https://gidrohim.com/node/2803>
- Качество поверхностных вод Российской Федерации: Ежегодник 2022. Ростов-на-Дону. 2023. 635 с.  
<https://gidrohim.com/node/2803>
- Кашулин Н.А., Сандимиров С.С., Даувальтер В.А., Терентьев П.М., Денисов Д.Б.* Экологический каталог озер Мурманской области. Часть 1. Северозападная часть Мурманской области и приграничные территории сопредельных стран. Апатиты. 2009. 226 с.
- Катанская В.М.* Высшая водная растительность континентальных водоемов СССР. Методы изучения. Л. 1981. 187 с.
- Кириллова Н.Р.* О распространении *Lemna minor* (Lemnaceae) в Мурманской области // *Бот. журн.* 2014. Т. 99. № 7. С. 766–770.
- Кравченко А.В., Боровичев Е.А., Химич Ю.Р., Фадеева М.А., Кутенков С.А., Костина В.А.* Значимые находки растений, лишайников и грибов на территории Мурманской области // *Труды Карельского научного центра РАН.* 2017. № 7. С. 34–50.  
<https://doi.org/10.17076/bg655>
- Кравченко А.В.* Сосудистые растения заповедника “Пасвик” и смежной территории Мурманской области. Петрозаводск. 2020. 281 с.
- Поспелова Е.Б.* Редкие виды сосудистых растений Государственного биосферного заповедника “Таймырский” // В кн.: *Исследование природы Таймыра.* Вып. 1. Красноярск. 2001. С. 216–239.

- Разумовская А.В., Петрова О.В. Сосудистые растения озера Имандра // Бот. журн. 2017. Т. 102. № 1. С. 62–78. <https://doi.org/10.1134/S0006813617010057>
- Раменская М.Л., Андреева В.Н. Определитель высших растений Мурманской области и Карелии. Л. 1982. 435 с.
- Румянцев В.А., Драбкова В.Г., Измайлова А.В. Озера европейской части России. СПб. 2015. 392 с. <http://wp.limno.org.ru/win/or.php>
- Сандимиров С.С. Современное гидрохимическое состояние озерно-речной системы реки Пасвик (Кольский полуостров) // Труды Кольского научного центра РАН. 2012. № 3 (10). С. 88–98.
- Bog M., Appenroth K., Sree K. Key to the determination of taxa of Lemnaceae: an update // Nord. J. Bot. 2020. V. 38. № 8. e02658. <https://doi.org/10.1111/njb.02658>
- GBIF – Global Biodiversity Information Facility. (12 December 2023) GBIF Occurrence Download. 2023a <https://doi.org/10.15468/dl.gqwvku>
- GBIF – Global Biodiversity Information Facility. (27 November 2023) GBIF Occurrence Download. 2023b <https://doi.org/10.15468/dl.876q72>
- GBIF – Global Biodiversity Information Facility. (12 December 2023) GBIF Occurrence Download. 2023c <https://doi.org/10.15468/dl.xnaya8>
- Landolt E. Morphological differentiation and geographical distribution of the *Lemna gibba* – *Lemna minor* group // Aquat. Bot. 1975. V. 1. P. 345–363.
- Landolt E. The family of Lemnaceae – a monographic study. Veröff. Geobot. Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zurich. 1986. 566 p.
- Landolt E. Lemnaceae Duckweed Family // Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science. 1992. V. 26. № 1. P. 10–14.
- Moiseenko T., Mjelde M., Brandrud T., Brettum P., Dauvalter V., Kagan L., Kashulin N., Kudriavtseva L., Lukin A., Sandimirov S., Traaen T.S., Vandysh O., Yakovlev V. Pasvik River Watercourse, Barents Region: Pollution Impacts and Ecological Responses. Investigations in 1993. Oslo. 1994. 87 p.
- Slukovskii Z., Dauvalter V., Guzeva A., Denisov D., Cherepanov A., Siroezhko E. The hydrochemistry and recent sediment geochemistry of small lakes of Murmansk, Arctic zone of Russia // Water. 2020. V. 12. № 4. P. 1–17. <https://doi.org/10.3390/W12041130>
- Volkova P.A., Nachatov V.A., Bobrov A.A. Hybrid between *Lemna minor* and *L. turionifera* (*L. × japonica*, Lemnaceae) in East Europe is more frequent than parental species and poorly distinguishable from them // Aquat. Bot. 2023. V. 184. 103593. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2022.103593>

## Distribution of *Lemna* at the Range Boundary in the North-West of the Murmansk Region as a result of anthropogenic changes in water bodies

N. V. Zueva<sup>1, #</sup>, O. G. Grishutkin<sup>2</sup>, D. Yu. Efimov<sup>2</sup>, A. A. Bobrov<sup>2, ##</sup>

<sup>1</sup>Russian State Hydrometeorological University, Voronezhskaya Str., 79, St. Petersburg, 192007 Russia

<sup>2</sup>Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, Nekouzskiy district, Yaroslavskaia region, 152742 Russia

<sup>#</sup>e-mail: nady.zuyeva@ya.ru

<sup>##</sup>e-mail: lsd@ibiw.yaroslavl.ru

Data on the new localities of *Lemna minor*, *L. trisulca*, and hybrid between *L. minor* and *L. turionifera* (*L. × japonica*) (Lemnaceae) in the north-west of the Murmansk Region (north of 68.5° N), i.e., in the Pasvik State Nature Reserve and neighboring territories in the drainage basin of the Paz River, are presented. *Lemna minor* and *L. trisulca* were previously known for the region by several reports. In the north-west of the Murmansk Region, 2 new localities of *Lemna minor*, 1 locality of *L. × japonica*, and 10 localities of *L. trisulca* were found. In total, representatives of *Lemna* occurred in 18 studied sites: *L. minor* in 2, *L. × japonica* in 2, and *L. trisulca* in 16 (*L. minor* and *L. trisulca* grew together in 2 sites). In the studied rivers and lakes, the pH range of water varied from 6.0 to 7.6, i.e., was mainly neutral (the average value was 6.9). TDS varied in the range from 17 to 251 ppm (on average, 53 ppm). The localities of *L. minor* in the unnamed lake near Zapolyarnyi town and in Kuetsjarvi Lake are probably the northernmost in the world, while locality of *L. trisulca* in the Paz River in Klistervatn Lake is the northernmost in European Russia. In the north of the Murmansk Region, *L. minor* and *L. × japonica* were associated only with anthropogenic eutrophicated water bodies with increased TDS in comparison to the background value. These taxa can be considered an indicator of high trophicity in this region. The localities of *L. trisulca* are mainly anthropogenic transformed water bodies. The maximum abundance of this species is also recorded in the areas of increased trophic level.

**Keywords:** aquatic plants, duckweed, eutrophication, Fennoscandia, Kola North, Kuetsjarvi Lake, *Lemna minor*, *Lemna trisulca*, *Lemna × japonica*, Paz River, pollution, Subarctic

УДК 582.651:581.16

**ARISTOLOCHIA СЕКЦИИ SIPHISIA IN VITRO**© 2024 г. О. В. Наконечная<sup>@</sup>, И. В. Гафицкая, Е. П. ЮсуповаФедеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН,  
просп. 100-летия Владивостока, 159, Владивосток, 690022 Россия<sup>@</sup>E-mail: markelova@biosoil.ru

Поступила в редакцию 29.12.2023 г.

После доработки 26.03.2024 г.

Принята к публикации 26.03.2024 г.

Результаты исследования представляют собой оптимизацию методики по клональному микроразмножению 4 видов рода *Aristolochia* секции *Siphisia* – редких, эндемичных и лекарственных растений. В работе использованы 6-бензиламинопурин (БАП) (0.5, 1.0, 1.2 и 1.4 мг/л) и индолилмасляная кислота (ИМК) (0.5 и 1.0 мг/л). Субкультивирование на разных питательных средах (МС с добавлением 0.5 мг/л БАП на этапе размножения и ½ ВПМ с добавлением 0.5 мг/л ИМК на этапе укоренения) способствовало массовому получению микрорастений. Максимальные значения высоты микропобегов каждого вида выявлены при использовании 0.5 мг/л БАП. Наибольшим потенциалом к размножению обладали экспланты *A. macrophylla* (коэффициент размножения равен 34 шт.) и *A. manshuriensis* (34 шт.), наименьшим – *A. californica* (18.6 шт.), что связано с активацией разного числа почек у каждого вида.

**Ключевые слова:** *Aristolochia*, редкий вид, лекарственное растение, *in vitro*, Приморский край

**DOI:** 10.31857/S1026347024060064, **EDN:** ukprkc

Виды рода *Aristolochia* L. (*Aristolochiaceae*) – лианы, кустарники и корневищные травы (Endress, 1990, 1994; Razzak *et al.*, 1992) – произрастают в тропической, субтропической и умеренной зонах всех континентов (Харкевич, 1987; Kelly, González, 2003). Представители рода – реликтовые растения, обладают лекарственными свойствами (Zhou *et al.*, 2011). Многие виды являются редкими (Ward *et al.*, 2003; Нестерова, 2008; Gong *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2021; Borah, Sarma 2022, etc.) из-за приуроченности к определенным биотопам, особенностей репродуктивной биологии видов (опыления, завязывания семян, их распространения и прорастания) и антропогенной нагрузки (срезки лиан, уничтожения биотопов). Для многих видов рода стоит вопрос о восстановлении природных популяций, поэтому необходимо подобрать методики для размножения растений видов *Aristolochia*.

Одним из способом восстановления численности растений в популяциях, а также для создания плантаций по выращиванию лекарственного сырья является метод клонального микроразмножения растений. Основными проблемами при использовании данного метода являются: получение стерильных растений, подбор состава питательных сред и условий для успешного развития микрорастений.

Ранее для видов рода метод микроклонального размножения был успешно применен (Manjula *et al.*, 1997; Siddique *et al.*, 2006; Biswas *et al.*, 2007; Osuna

*et al.*, 2007; Veluchamy, Rajappan, 2008; Saidi *et al.*, 2009; Sathish *et al.*, 2011; Remya *et al.*, 2013; Sarma, Tanti, 2017; Молканова и др., 2018 и др.). Между тем, как показал анализ литературных данных, многие из введенных в условия *in vitro* видов являются травянистыми лианами. Размножение одревесневающих видов рода – более сложная задача.

В нашей работе мы использовали четыре вида рода *Aristolochia* секции *Siphisia*: *A. californica* Torr., *A. tomentosa* Sims, *A. macrophylla* Lam. *A. manshuriensis* Kom. Первые три вида – представители североамериканской флоры, четвертый произрастает на территории Китая и юге Приморского края России (Наконечная и др., 2014). Каждый из видов *Aristolochia* – это многолетние одревесневающие лианы, обладающие лекарственными свойствами. Так, корни *A. californica* используют как горький тоник, способствующий улучшению аппетита и восстановлению азотистого обмена, улучшению метаболизма белков печени, очистке лейкоцитов и усилению метаболизма за счет стимуляции макрофагов (Moore, 1993). В Индии корни *A. macrophylla* применяют наружно для лечения опухших ног (Duke, 1986). Стебли *A. manshuriensis* используют для лечения проблем, связанных с мочевым пузырем, как мочегонное, противобактериальное, жаропонижающее средство; применяют при лечении заболеваний, передающихся половым путем, камнях в почках, при язвах во рту, беспокойстве,

ревматизме и ревматоидном артрите (Craker, Simon, 1989; Tang, Eisenbrand, 1992; Ling, 1995; Padua *et al.*, 1999; Wu, 2005; Lans, 2007), аменорее, диабете, водянке, для улучшения лактации (Perry, Metzger, 1980; Duke, Ayensu 1985; Craker, Simon, 1989; Huang 1993), при желтухе (Ling, 1995). В Северной Каролине (США) *A. tomentosa* использовали как средство, стимулирующее потоотделение и аппетит, а также как отхаркивающее; его используют при лихорадках и различных расстройствах желудочно-кишечного тракта; применяют при болезнях горла, лечении змеиных укусов и для улучшения менструального цикла у женщин (Foster, Duke, 1977). Каждый из данных видов является редким.

Цель настоящей работы заключалась в подборке методик для размножения одревесневающих видов секции *Siphisia* рода *Aristolochia*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Введение в условия *in vitro* и культивирование проводили в секторе микрклонального размножения лесных, сельскохозяйственных и декоративных культур ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН (г. Владивосток) в 2018–2023 гг.

Для эксперимента в качестве первичных эксплантов использовали черенки молодых побегов с 2 пазушными почками и верхушечные побеги видов секции *Siphisia* – *A. californica*, *A. macrophylla*, *A. manshuriensis* и *A. tomentosa*. Экспланты *A. manshuriensis* получены с растений, произрастающих в естественных популяциях на юге Приморского края России. Экспланты 3 видов (*A. californica*, *A. macrophylla* и *A. tomentosa*) получены с растений, выращенных из семян и произрастающих в условиях закрытого грунта в частной коллекции. Стерилизация эксплантов, питательных сред и условия культивирования представлены ранее (Gafitskaya *et al.*, 2022).

Для культивирования использовали питательную среду по прописи МС (Murashige, Skoog, 1962) с добавлением 6-бензиламинопурина (БАП) в концентрациях 0.5, 1, 1.2 и 1.4 мг/л, рН питательной среды – 4.6–4.8. Для укоренения применяли питательную среду по прописи ВПМ (WPM) (Lloyd, McCown, 1980) в половинной концентрации микро- и макросолей с добавлением ауксина – индолмасляной кислоты (ИМК) в концентрациях 1 и 0.5 мг/л, рН питательной среды – 4.6–4.8. Для контроля использовали питательную среду по прописи МС с половинной концентрацией микро- и макросолей без добавления гормонов.

Для оценки параметров роста один раз в месяц в течение всего периода культивирования измеряли высоту растений и длину корней, подсчитывали

число листовых узлов, побегов, корней. Коэффициент микроразмножения считали как среднее по опыту количество микрочеренков, полученных от одного микропобега за один пассаж, умноженное на число микропобегов (длительность культивирования – 2 месяца). Полученные данные обрабатывали с использованием пакета программ Microsoft Office Excel. В табл. 1, 2 и на рис. 1 приведены среднеарифметические значения параметров роста со стандартной ошибкой ( $n = 30$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Размножение in vitro*

Культивирование контрольной группы эксплантов на питательной среде  $1/2$  МС не приводило к морфогенезу. Экспланты не развивались.

Анализ результатов, полученных при культивировании с добавлением гормонов, показал, что высота микропобегов *A. californica* через 1 месяц культивирования была максимальной при применении

**Таблица 1.** Морфометрическая характеристика 4 видов рода *Aristolochia* через 1 месяц культивирования на питательной среде МС с добавлением фитогормона БАП в различных концентрациях

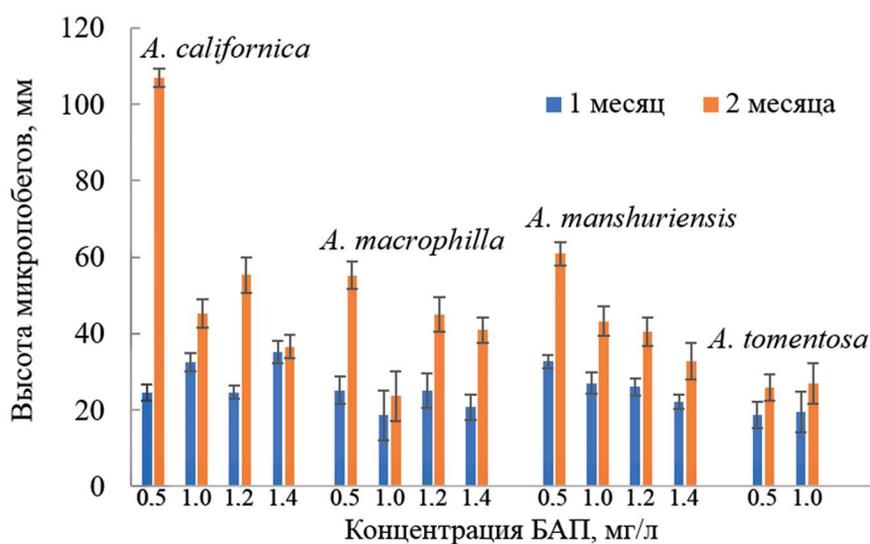
Концентрация БАП, мг/л	Число листовых узлов, шт.	Число микропобегов, шт.
<i>Aristolochia californica</i>		
1.4	2.51 ± 1.03	1.38 ± 0.11
1.2	1.4 ± 0.16	1.6 ± 0.18
1.0	2.89 ± 1.67	1.43 ± 0.19
0.5	2.4 ± 0.20	1.22 ± 0.12
<i>Aristolochia macrophylla</i>		
1.4	2.58 ± 1.16	1.83 ± 0.31
1.2	3.11 ± 1.53	2.38 ± 0.42
1.0	2.44 ± 1.63	0.81 ± 0.08
0.5	3.33 ± 0.24	3.09 ± 0.39
<i>Aristolochia manshuriensis</i>		
1.4	2.41 ± 0.24	1.34 ± 0.08
1.2	3.64 ± 0.52	1.73 ± 0.21
1.0	4.05 ± 0.36	2 ± 0.15
0.5	5.05 ± 0.59	2.24 ± 0.29
<i>Aristolochia tomentosa</i>		
1.4	–	–
1.2	–	–
1.0	2.19 ± 0.96	1.24 ± 0.14
0.5	3.89 ± 0.35	1.78 ± 0.28

Примечание. Отсутствуют значения параметра.

**Таблица 2.** Морфометрическая характеристика 4 видов рода *Aristolochia* через 2 месяца культивирования на питательной среде МС с добавлением фитогормона БАП в различных концентрациях

Концентрация БАП, мг/л	Число листовых узлов, шт.	Число микропобегов, шт.	Коэффициент размножения, шт.
<i>Aristolochia californica</i>			
1.4	3.75 ± 0.63	1.5 ± 0.29	5.6
1.2	5.88 ± 0.43	1.69 ± 0.12	9.9
1.0	6.68 ± 0.73	1.75 ± 0.17	11.7
0.5	7.53 ± 0.42	2.47 ± 0.35	18.6
<i>Aristolochia macrophylla</i>			
1.4	6.5 ± 0.56	2.58 ± 0.83	16.8
1.2	8.5 ± 1.38	2.83 ± 0.83	24
1.0	5.97 ± 1.44	2.69 ± 0.39	16.6
0.5	7.27 ± 1.31	4.71 ± 2.56	34
<i>Aristolochia manshuriensis</i>			
1.4	4.55 ± 0.59	1.91 ± 0.21	8.7
1.2	4.41 ± 0.73	2.84 ± 0.27	12.5
1.0	6.31 ± 0.92	3.7 ± 0.64	23.3
0.5	8.8 ± 0.59	3.88 ± 0.21	34
<i>Aristolochia tomentosa</i>			
1.4	—	—	—
1.2	—	—	—
1.0	4.66 ± 1.20	1.67 ± 0.33	7.8
0.5	7.5 ± 1.16	3.5 ± 0.52	26

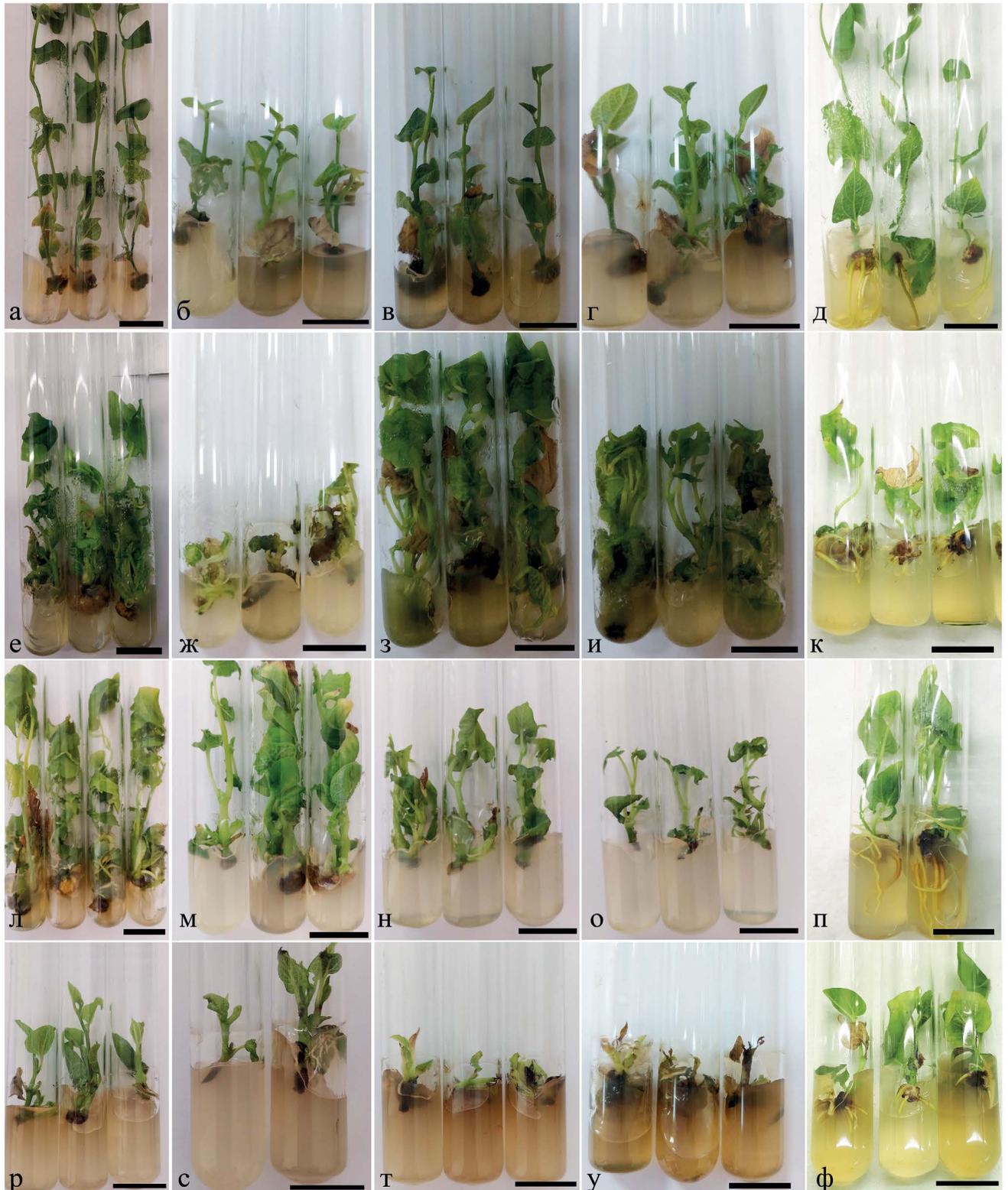
Примечание. — отсутствуют значения параметра.



**Рис. 1.** Высота микропобегов *Aristolochia*, культивированных 1 и 2 месяца на питательной среде МС с добавлением фитогормона БАП в различных концентрациях.

питательной среды с добавлением БАП в концентрации 1.4 и 1.0 мг/л (рис. 1) по сравнению со значением параметра у других вариантов опыта.

Также отмечено, что при этих же концентрациях формировалось большее число листовых узлов (табл. 1). Между тем при культивировании



**Рис. 2.** Микропобеги *A. californica* (а–д), *A. macrophylla* (е–к), *A. manshuriensis* (л–п) и *A. tomentosa* (р–ф) после 2 месяцев культивирования на питательной среде МС с добавлением гормонов БАП в разных концентрациях 0.5, 1.0, 1.2 и 1.4 мг/л и ИМК. Масштаб – 1 см.

на среде с добавлением БАП в концентрации 1.2 мг/л наблюдали максимальное число побегов.

Высота микропобегов, так же как и число листовых узлов *A. macrophylla*, через 1 месяц культивирования были максимальными при культивировании на питательной среде с добавлением БАП в концентрации 0.5 мг/л (рис. 1). Наибольшее число побегов отмечено при использовании концентраций 1.2 и 0.5 мг/л БАП (табл. 1).

Для *A. manshuriensis* и *A. tomentosa* максимальные значения всех параметров отмечены при культивировании на питательной среде с добавлением БАП в концентрации 0.5 мг/л (табл. 1). Минимальные значения параметров *A. manshuriensis* получены при использовании гормона в его максимальной концентрации. Добавление больших концентраций гормона (1.4 мг/л) в питательную среду для *A. tomentosa* привело к гибели эксплантов.

Через 2 месяца наблюдения за регенерантами было выявлено, что микропобеги *A. californica* при культивировании на питательных средах с максимальными концентрациями БАП остановились в развитии и характеризовались минимальными значениями высоты (рис. 1, 2). В то же время культивирование при низкой концентрации гормона способствовало получению максимальных значений исследованных параметров.

Для микропобегов *A. macrophylla* наблюдали схожую тенденцию – значения высоты максимальны при культивировании на среде с минимальным для опыта добавлением гормона (рис. 1, 2). Использование гормона всех концентраций привело к активации большого количества адвентивных почек.

Микропобеги *A. manshuriensis* за 2 месяца культивирования сохранили тенденцию к активному росту и увеличились почти в 2 раза (рис. 1). Максимальные значения всех параметров отмечены в вариантах опыта при низких концентрациях гормона. При повышении концентрации гормона в питательной среде значения параметров снижались.

Микропобеги *A. tomentosa*, культивированные на питательной среде с добавлением БАП в концентрации 0.5 и 1.0 мг/л близки по значениям высоты ( $25.87 \pm 3.42$  мм и  $26.94 \pm 5.35$  мм, соответственно; рис. 1, 2), число листовых узлов ( $7.5 \pm 1.16$ .) и микропобегов ( $3.5 \pm 0.52$ .) больше при культивировании на питательной среде с низкой концентрацией гормона (0.5 мг/л, табл. 2).

Максимальные значения коэффициента размножения отмечены при культивировании эксплантов на питательной среде с добавлением БАП в концентрации 0.5 для всех видов.

### Укоренение in vitro

Поскольку одревесневающие представители секции *Siphisia* не проявляли способности к спонтанному корнеобразованию на той же питательной среде, на которой развивались микропобеги, нами была проделана работа по подбору компонентов и их концентраций для индукции корней. На среде с повышенной концентрацией гормона ИМК (1 мг/л) рост корней не наблюдали, экспланты погибали. При использовании меньшей концентрации ауксина корнеобразование проходило успешно (табл. 3, рис. 2). Анализ результатов показал, что наибольшая высота отмечена у микро-растений *A. californica*. Такие параметры как число и длина корней наибольшие у *A. macrophylla*.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов по культивированию представителей секции *Siphisia* показал, что лучшей для развития микропобегов является питательная среда с добавлением 0.5 мг/л БАП. Увеличение концентрации гормона приводило к подавлению развития микропобегов, негативно сказывалось на внешнем виде. Для *A. tomentosa* концентрация БАП 1.2 и 1.4 мг/л была высокой, вследствие чего вероятный синтез полифенолов в эксплантах усиливался. Полифенолы ингибировали активность необходимых для роста микропобега ферментов, вызывая потемнение тканей экспланта и среды, что приводило к гибели экспланта.

При применении питательной среды с добавлением 0.5 мг/л ИМК укоренение проходило успешно, в то время как использование большей концентрации гормона ИМК (1 мг/л) приводило к гибели экспланта. В работах О.И. Молкановой с соавторами (Молканова, Егорова, 2017; Молканова и др., 2018; Molkanova *et al.*, 2018) была применена концентрация гормона, превышающая нами подобранную в 6 и 8 раз. При высоких концентрациях гормонов и долгом культивировании

**Таблица 3.** Морфометрическая характеристика 4 видов рода *Aristolochia* через 2 месяца культивирования на питательной среде ½ ВПМ с добавлением фитогормона ИМК в концентрации 0.5 мг/л

Виды <i>Aristolochia</i>	Высота растения, мм	Число листовых узлов, шт.	Число корней, шт.	Длина корней, мм
<i>A. californica</i>	$27.67 \pm 3.22$	$2.89 \pm 0.21$	$2.33 \pm 0.30$	$16.02 \pm 2.66$
<i>A. macrophylla</i>	$17.19 \pm 6.75$	$2.83 \pm 0.24$	$5.75 \pm 1.65$	более 25.55
<i>A. manshuriensis</i>	$16.76 \pm 1.26$	$3 \pm 0.23$	$4.82 \pm 0.61$	$18.57 \pm 2.47$
<i>A. tomentosa</i>	$23.9 \pm 4.31$	$4 \pm 0$	$5.5 \pm 0.5$	$21.5 \pm 3.5$

растений происходит их накопление в тканях выше необходимого физиологического уровня, что ведет к интоксикации и развитию растений с измененной морфологией. Кроме этого, возможен эффект подавления пазушных меристем, образования витрифицированных побегов и ингибирования корнеобразования (с. 19, Катаева, Бутенко, 1983). Также большие концентрации гормонов способны привести к появлению мутаций и возникновению генетической неоднородности микроклонов.

Максимальные значения коэффициента размножения получены при использовании минимальных концентраций гормона. Наибольшим потенциалом к размножению обладали экспланты *A. macrophylla* (34 шт.) и *A. manshuriensis* (34 шт.), наименьшим — *A. californica* (18,6 шт.). Это связано с тем, что у данного вида происходит активация меньшего числа почек по сравнению с другими исследованными видами.

Полученные нами результаты показали, что использование метода микроклонального размножения значительно сокращает время для получения растений, по своему развитию соответствующих ювенильному состоянию онтогенеза. Как показано ранее, при прорастании семян *A. manshuriensis* необходим длительный период времени для доразвития зародыша (13 месяцев) (Nakonetchnaya et al., 2018). Развитие проростков до ювенильного состояния длится 3–4 месяца (Наконечная и др., 2014). В то же время при микроклональном размножении от момента посадки экспланта до достижения ювенильного состояния проходит 4 месяца. Семена *A. macrophylla* в условиях эксперимента прорастали быстрее (в течение 6 месяцев), чем семена *A. manshuriensis* (Nakonetchnaya et al., 2018). Но необходимо время на доразвитие зародыша так же, как и семенам *A. californica* и *A. tomentosa* (Adams et al., 2005). Таким образом, использование метода позволяет сократить период развития растений, что может быть успешно применено при размножении ценных растений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение метода микроклонирования для редких видов, среди которых представители секции *Siphisia*, показало успешное размножение и укоренение микропобегов. Подобранные концентрации фитогормонов позволяют получить микрорастения с хорошо развитой корневой системой, готовые к пересадке в условия закрытого почвогрунта. Применение протоколов для размножения и укоренения позволит сохранить ценные лекарственные ресурсы не только Приморского края, но и видов, обитающих в разных частях земного шара.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 124012200181-4.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## БИОЭТИКА

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Катаева Н. В., Бутенко Р. Г. Клональное микроразмножение. М.: Наука, 1983. 96 с.
- Молканова О. И., Любимова Е. И., Коновалова Л. Н., Егорова Д. А. Способ клонального микроразмножения кирказона маньчжурского (*Aristolochia manshuriensis* Kom.) // Патент на изобретение RU2662682 С2 от 26.07.2018.
- Молканова О. И., Егорова Д. А. Некоторые аспекты культивирования *in vitro* *Aristolochia manshuriensis* Kom. // Вестник УдмГУ. Серия «Биология. Науки о Земле». 2017. Т. 27. С. 151–157.
- Наконечная О. В., Журавлев Ю. Н., Булгаков В. П., Корень О. Г., Сундукова Е. В. Род кирказон на Дальнем Востоке России (*Aristolochia manshuriensis* Kom. и *A. contorta* Bunge). Владивосток: Дальнаука, 2014. 153 с.
- Нестерова С. В. Кирказон скрученный // Красная книга Приморского края: Растения. Владивосток: Апельсин, 2008. С. 65.
- Харкевич С. С. Сем. *Aristolochiaceae* // Сосудистые растения Советского Дальнего Востока / Отв. ред. С. С. Харкевич. Л.: Наука, 1987. Т. 2. С. 19–21.
- Adams C. A., Baskin J. M., Baskin C. C. Trait stasis versus adaptation in disjunct relict species: evolutionary changes in seed dormancy-breaking and germination requirements in a subclade of *Aristolochia* subgenus *Siphisia* (Piperales) // Seed Sci. Res. 2005. V. 15. N 2. P. 161–173.  
<https://doi.org/10.1079/SSR2005207>
- Biswas A., Bari M. A., Roy M., Bhadra S. K. *In vitro* regeneration of *Aristolochia tagala* Champ. a rare medicinal plant of Chittagong hill tracts // J. bio-sci. 2007. V. 15. P. 63–67.  
<http://www.banglajol.info/index.php/JBS/index>
- Borah P. J., Sarma R. GC-MS analysis and qualitative phytochemical screening of *Aristolochia assamica*, a newly

- discovered rare medicinal plant species of India // Indian J. Nat. Prod. Resour. 2022. V. 13. N 4. P. 552–558. <https://doi.org/10.56042/ijnpr.v13i4.60111>
- Craker L., Simon J. Herbs, spices and medicinal plants: recent advances in botany, horticulture, and pharmacology. Phoenix, AZ: Oryx Press, 1989. 230 p.
- Duke J.A. Handbook of Northeastern indian plants. Lincoln, MA: Quaterman Publ., 1986. 33 p.
- Duke J.A., Ayensu E.S. Medicinal plants of China. Algonac, MI: Reference Publications, 1985. 705 p.
- Endress P.K. Evolution of reproductive structures and functions in primitive angiosperms (Magnoliidae) // Mem. New York Bot. Gard. 1990. V. 55. P. 5–34.
- Endress P.K. Floral structure and evolution of primitive angiosperms: recent advances // Plant Syst. Evol. 1994. V. 192. P. 79–97. <https://doi.org/10.1007/BF00985910>
- Foster S., Duke J.A. A field guide to medicinal plants: eastern and central North America. Peterson Field Guide Series. Boston: Houghton Mifflin Co., 1977. 366 p.
- Gafitskaya I.V., Bezdelev A.B., Nakonechnaya O.V. *Dracoccephalum charkeviczii* Prob. *in vitro* // Botanica Pacifica. A journal of plant science and conservation. 2022. V. 11. N 1. P. 83–86. <https://doi.org/10.17581/bp.2022.11101>
- Gong Q.B., Landrein S., Xi H.C., Ma X.D., Yang Z.H., He K.W., Shen J.Y. *Aristolochia tongbiguanensis*, a new species of *Aristolochiaceae* from Yunnan, China // Taiwan. 2018. V. 63. N 3. P. 183–187. <https://doi.org/10.6165/tai.2018.63.183>
- Huang K.C. The pharmacology of chinese herbs. Boca Raton, FL: CRC Press, 1993. 534 p.
- Kelly L.M., González F. Phylogenetic relationships in *Aristolochiaceae* // Syst. Bot. 2003. V. 28. P. 236–249. <https://doi.org/10.1043/0363-6445-28.2.236>
- Lans C. Comparison of plants used for skin and stomach problems in Trinidad and Tobago with Asian ethnomedicine // J Ethnobiology Ethnomedicine. 2007. V. 3. N 3. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-3-3>
- Ling Y.R. A New Compendium of Materia Medica: Pharmaceutical Botany and Chinese Medicinal Plants. Science Press, Beijing, 1995. 292 p.
- Lloyd G., McCown B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture // Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc. 1980. V. 30. P. 421–427.
- Manjula S., Thomas A., Daniel B., Nair G.M. *In vitro* plant regeneration of *Aristolochia indica* through axillary shoot multiplication and organogenesis // Plant cell, tissue, and organ culture. 1997. V. 51. P. 145–148. <https://doi.org/10.1023/A:1005978125424>
- Molkanova O.I., Gorbunov Y.N., Egorova D.A. Conservation and clonal micropropagation of rare endemic species *Aristolochia manshuriensis* // VIII International Scientific and Practical Conference on Biotechnology as an Instrument for Plant Biodiversity Conservation 1324. 2018. P. 19–26. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1324.3>
- Moore M. Medicinal plants of the Pacific West. Santa Fe: Red Crane Books, 1993. 360 p.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. N 3. P. 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nakonechnaya O.V., Nesterova S.V., Voronkova N.M. Germination of *Aristolochia* seeds (*Aristolochiaceae*) // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2018. V. 73. P. 209–216. <https://doi.org/10.3103/S0096392518040077>
- Osuna L.T., Mora A.E., Enrique V.Z., Jimenez F., Baza-Idua C.M., Jimenez A.A. Micropropagation of *Aristolochia elegans* (Mast.) // J. Crop Sci. Biotechnol. 2007. V. 10. P. 141–146.
- Padua L.S., Bunypraphatsra N., Lemmens R.H.M.J. Medicinal and poisonous plants. Leiden: Backhuys Publishers, 1999. 711 p. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1999.tb01149.x>
- Perry L.M., Metzger J. Medicinal plants of East and Southeast Asia: Attributed properties and uses. London: Press Cambridge, MA, 1980. 630 p. <http://kdb.kew.org/kdb/detailedresult.do?id=63960>
- Razzak M.A., Ali T., Ali S.I. The pollination biology of *Aristolochia bracteolata* Lamk (*Aristolochiaceae*) // Pak. J. Bot. 1992. V. 24. № 1. P. 79–87. <http://142.54.178.187:9060/xmlui/handle/123456789/16848>
- Remya M., Narmatha Bai V., Mutharaian V.N. *In vitro* regeneration of *Aristolochia tagala* and production of artificial seeds // Biol. Plant. 2013. V. 57. P. 210–218. <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0280-2>
- Saidi F., Cherif H.S., Metidji H., Rouibia A., Chaouia C., Abdhussain M.S., Said R.M., Hamaidi M.S. Studies on the *in vitro* multiplication by direct organogenesis of a medicinal plant: *Aristolochia longa* L. // Agricultura-Revistă de Scedilla tiintcedilla ă scedilla i Practică Agricolă. 2009. P. 53–65.
- Sarma B., Tanti B. *In vitro* regeneration of plantlets from nodal explants of *Aristolochia saccata* and *Aristolochia cathartii* // Eur. J. Biol. Res. 2017. V. 7. P. 191–201. <https://doi.org/10.5281/zenodo.825746>
- Sathish S.S., Janakiraman N., Johnson M. *In vitro* propagation of *Aristolochia bracteata* Retz. – a medicinally important plant // Res. Biotechnol. 2011. V. 2. P. 44–52.
- Siddique N.A., Bari M.A., Pervin M.M., Nahar N., Banu L.A., Paul K.K., Kabir M.H., Huda A.K.M.N., Ferdous K.M.K.B., Hossin M.J. Plant regeneration from axillary shoots derived callus in *Aristolochia indica* Linn. an endangered medicinal plant in Bangladesh // Pak J Biol Sci. 2006. V. 9. P. 1320–1323. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2006.1320.1323>
- Tang W., Eisenbrand G. Chinese drugs of plant origin: chemistry, pharmacology, and the use in traditional and modern medicine. Springer-Verlag, Berlin/New York. 1992. 1056 p.
- Veluchamy S., Rajappan A.P. Stimulation of Micropropagation of the Medicinal Plant *Aristolochia indica* L. through

- Nodal Explants by Adenine Sulphate // Asian and Australasian J Plant Sci Biotech. 2008. V. 2. P. 39–41.
- Ward D. B., Austin D. F., Coile N. C. Endangered and threatened plants of Florida, ranked in order of rarity // Castanea. 2003. V. 68. N 2. P. 160–174. <https://www.jstor.org/stable/4034305>
- Wu J. N. An illustrated Chinese Materia Medica. Oxford, UK: Oxford University Press, 2005. 716 p.
- Yu Y. L., Wang H. C., Yu Z. X., Schinnerl J., Tang R., Geng Y. P., Chen G. Genetic diversity and structure of the endemic and endangered species *Aristolochia delavayi* growing along the Jinsha River // Plant Diversity. 2021. V. 43. N 3. P. 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2020.12.007>
- Zhou J., Xie G., Yan X. Encyclopedia of traditional Chinese medicines: molecular structures, pharmacological activities, natural sources and applications. V. I – 557 p.; V. II – 525 p.; V. III – 669 p.; V. IV – 636 p.; V. V – 601 p.; V. VI – 730 p. Berlin – Heidelberg: Springer-Verlag. 2011.

### *Aristolochia* of *Siphisia* section *in vitro*

O. V. Nakonechnaya<sup>#</sup>, I. V. Gafitskaya, E. P. Yusupova

Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

<sup>#</sup>E-mail: [markelova@biosoil.ru](mailto:markelova@biosoil.ru)

The results of the study represent an optimization protocol for clonal micropropagation of 4 species of the genus *Aristolochia*, *Siphisia* section. Plants of these species are rare, endemic and medicinal plants. 6-Benzylaminopurine (BAP) (0.5, 1.0, 1.2 and 1.4 mg/L) and indolylbutyric acid (IBA) (0.5 and 1.0 mg/L) were used in this work. The use of subcultivation with different nutrient media (MS supplemented with 0.5 mg/l BAP at the propagation stage and ½ WPM with the addition of 0.5 mg/l IBA at the rooting stage) contributes to the mass production of microplants. The maximum values of the microshoot height for each species were detected on the medium with 0.5 mg/l BAP. Explants of *A. macrophylla* and *A. manshuriensis* were characterized with the greatest reproduction coefficient (34 pcs.); while *A. californica* explants displayed the least coefficient (18.6 pcs.). The difference is associated with the activation of a different number of buds in each species.

**Keywords:** *Aristolochia*, rare species, medicinal plant, *in vitro*, Primorsky Krai

УДК 581.1

## АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И ЭКСПРЕССИЯ КОДИРУЮЩИХ ИХ ГЕНОВ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ С РАЗНЫМ АЛЛЕЛЬНЫМ СТАТУСОМ ГЕНА *GPC-B1* ПРИ ОПТИМАЛЬНОМ СОДЕРЖАНИИ ЦИНКА В СРЕДЕ И ЕГО ДЕФИЦИТЕ

© 2024 г. Ю. В. Батова<sup>®</sup>, Н. С. Репкина, А. А. Игнатенко, Н. М. Казнина

Институт биологии Карельского научного центра РАН, ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185910 Россия  
<sup>®</sup>E-mail: batova.krc@mail.ru

Поступила в редакцию 12.10.2023 г.

После доработки 29.05.2024 г.

Принята к публикации 31.05.2024 г.

Показано, что растения мягкой пшеницы изученных образцов устойчивы к дефициту цинка в корнеобитаемой среде. Обнаружены различные пути адаптации к этим условиям со стороны антиоксидантной системы у растений, имеющих функциональный аллель гена *GPC-B1*. Так, у растений линии 15-7-1 сохранение окислительно-восстановительного баланса клеток связано с возрастанием экспрессии гена *Cu/ZnSOD* и снижением экспрессии генов *FeSOD* и *CAT1*, а у растений линии 13-3, помимо повышения количества транскриптов гена *Cu/ZnSOD*, – с высокой конститутивной активностью супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ). Полученные данные могут быть использованы при создании сортов (линий) пшеницы, способных при выращивании в условиях дефицита цинка в почве формировать семена с относительно высоким содержанием этого микроэлемента.

**Ключевые слова:** пшеница, дефицит цинка, ген *GPC-B1*, рост, супероксиддисмутазы, каталаза

**DOI:** 10.31857/S1026347024060076, **EDN:** ukpnr

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) – одна из главных зерновых культур, которая обеспечивает до 20% потребности человека в белках и энергии, а также является важным источником микроэлементов (Velu *et al.*, 2019). Поэтому улучшению состава и питательной ценности зерна этой культуры во всем мире уделяется повышенное внимание. Вместе с тем проводимая в течение длительного времени интенсивная селекция пшеницы, направленная на повышение ее семенной продуктивности, сопровождалась постепенным ухудшением качества зерна, и прежде всего обеднением его микроэлементного состава (Tabbitta *et al.*, 2017). В результате, по оценкам Всемирной организации здравоохранения более 2 млрд. человек в мире страдают от дефицита микроэлементов, в особенности цинка и железа, что проявляется в общем ухудшении здоровья, увеличении заболеваемости и уровня смертности, низкой производительности труда (ВНО, 2017). Исходя из этого, проблема дефицита микроэлементов (так называемый «скрытый голод») уже на протяжении нескольких десятилетий является приоритетным направлением исследований в разных областях науки (Velu *et al.*, 2014; Cakmak *et al.*, 2017).

Согласно литературным данным, наиболее эффективным и экономически оправданным подходом к решению этой проблемы является биофортификация – повышение концентрации микроэлементов в зерне злаков путем улучшения их генетических качеств, в том числе с использованием методов селекции (Velu *et al.*, 2014). В частности, значительные успехи в этом направлении были достигнуты благодаря использованию метода отдаленной гибридизации, целью которого является создание сортов, сочетающих признаки и свойства разных видов. Так, было обнаружено, что некоторые виды дикорастущих пшениц способны накапливать в зерновках гораздо больше белка и микроэлементов, чем современные сорта мягкой пшеницы (Guzman *et al.*, 2014; Муртофанова, Хакимова, 2016; Saini *et al.*, 2023). Во многом это связано с наличием в их геноме функционального аллеля гена *GPC-B1* (*grain protein content*) (или *NAM-B1*), относящегося к NAC семейству транскрипционных факторов. Кодированный этим геном белок *GPC-B1* участвует в процессе ремобилизации азота и ряда микроэлементов, включая цинк, из стареющих листьев в колос (Uauy *et al.*, 2006; Waters *et al.*, 2009).

Как оказалось, у большинства современных сортов пшеницы копия этого гена нефункциональна. Однако в результате их скрещивания с дикорастущими злаками из рода *Triticum*, например с пшеницей двузернянкой (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*), были получены изогенные линии, у которых аллель гена *GPC-B1* функционален. При этом они отличались большим, чем растения исходных сортов, содержанием в зерне белка, Fe и Zn (Genc, McDonald, 2004; Guzman *et al.*, 2014; Мумрофанова, Хакимова, 2016). Более того, было обнаружено, что такие линии могут быть устойчивыми к недостатку микроэлементов, в частности цинка (Игнатенко и др., 2021). Однако возможные механизмы, обеспечивающие такую устойчивость, практически не изучены.

Одним из важных условий успешной адаптации растений к неблагоприятным факторам внешней среды является эффективная работа антиоксидантной системы, что позволяет сохранять оптимальный окислительно-восстановительный баланс в клетках и поддерживать структурно-функциональную целостность клеточных мембран. Дефицит цинка, как любое стрессовое воздействие, вызывает у растений окислительный стресс, связанный с усилением образования активных форм кислорода (АФК), накоплением продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и ослаблением антиоксидантной защиты (Сакмак, 2000). Причины развития окислительного стресса при дефиците цинка разнообразны, поскольку этот металл выполняет множество функций в растительных клетках (Marschner, 1995). Показано, что устойчивость растений к недостатку цинка коррелирует с активностью Zn-зависимых ферментов, а также уровнем экспрессии кодирующих их генов (Nacisalihoglu *et al.*, 2003, Pandey *et al.*, 2012). Среди них наиболее важным у растений является супероксиддисмутаза (СОД), в частности ее Zn-содержащая изоформа Cu/Zn-СОД, которая играет важную роль в защите растений от окислительных повреждений, вызываемых супероксидом (Gill *et al.*, 2015). Снижение активности СОД при дефиците цинка отмечали многие исследователи (Сакмак *et al.*, 1998; Nacisalihoglu *et al.*, 2003 Pandey *et al.*, 2012). Недостаток этого микроэлемента негативно влияет и на активность ферментов, участвующих в детоксикации  $H_2O_2$ , таких как каталаза (КАТ) (Сакмак, Marschner, 1993; Pandey *et al.*, 2012). Все эти данные свидетельствуют о том, что способность растений поддерживать высокую активность антиоксидантных ферментов в условиях дефицита цинка является одним из механизмов, обеспечивающих их устойчивость к этому виду стрессового воздействия.

Исходя из этого, целью данного исследования было изучение активности СОД и КАТ, а также уровня экспрессии кодирующих их генов (*Cu/*

*ZnSOD*, *FeSOD* и *CAT1*) в листьях растений пшеницы, различающихся аллельным статусом гена *GPC-B1*, при оптимальном и низком уровне цинка в корнеобитаемой среде.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили растения мягкой пшеницы сорта Фестивальная (далее – сорт), имеющие нефункциональный аллель гена *GPC-B1*, и две интрогрессивные линии пшеницы, выделенные в потомстве от скрещивания *T. aestivum* сорта Фестивальная с *Triticum dicoccoides*, у которых аллель этого гена функционален (линия 15-7-1 и линия 13-3). Семена пшеницы были любезно предоставлены чл.-корр. НАН Беларуси Н.И. Дубовец и к.б.н. О.А. Орловской (Институт генетики и цитологии НАН Беларуси). Аллельный статус гена был установлен с использованием кодоминантного маркера Xuhw89 (Vishwakarma *et al.*, 2014). Семена проращивали в чашках Петри на дистиллированной воде в течение 2 сут, после чего переносили на питательный раствор Хогланда – Арнона с концентрацией цинка 2 мкМ (Zn 2, контроль) или на раствор без добавления соли цинка (Zn 0, опыт). Химический анализ питательного раствора опытного варианта, проведенный с использованием атомно-абсорбционного спектрофотометра AA-700 (Shimadzu, Япония), показал, что концентрация цинка в нем не превышала 0.05 мкМ.

Опыты проводили в контролируемых условиях при температуре 22°C, относительной влажности воздуха 60–70%, фотосинтетически активной радиации (ФАР) 100 мкмоль/(м<sup>2</sup>·с), 14-часовом фотопериоде. Анализ растений проводили спустя 14 сут экспозиции, по достижению ими фазы начала 3-го листа. Об их устойчивости к недостатку цинка судили на основании изменения по отношению к контролю показателей, характеризующих рост побега (высота, сырая и сухая биомасса). Помимо этого определяли интенсивность ПОЛ, общую активность СОД и КАТ, а также количество транскриптов генов *Cu/ZnSOD*, *FeSOD* и *CAT1* в листьях.

Интенсивность ПОЛ оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА), которое определяли с использованием реакционной среды, содержащей 0.25% раствор тюрбарбитуровой кислоты в 10% трихлоруксусной кислоте (Heath, Packer, 1968). Растительный материал гомогенизировали в реакционной среде. Гомогенат выдерживали на водяной бане при 95°C в течение 30 мин, быстро охлаждали и центрифугировали 10 мин при 10000 g. Оптическую плотность супернатанта измеряли с использованием спектрофотометра СФ-2000 (“Спектр”, Россия) при 532 и 600 нм. Для расчета содержания МДА (нмоль/г сырой массы) использовали коэффициент

экстинкции, равный  $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Для определения активности СОД (КФ 1.15.1.1.) и КАТ (КФ 1.11.1.6.) листья гомогенизировали в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.8). Гомогенат центрифугировали при 15000 г в течение 20 мин при 4°C, полученный супернатант использовали для определения содержания белка и активности ферментов спектрофотометрическим методом. Активность СОД определяли по способности ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия (Beauchamp, Fridovich, 1971). Оптическую плотность раствора измеряли при 560 нм. За единицу активности принимали количество фермента, вызывающее 50% ингибирование реакции. Активность каталазы определяли по скорости разложения  $\text{H}_2\text{O}_2$ , регистрируя изменение оптической плотности раствора при длине волны 240 нм в течение 1 минуты (Aebi, 1984). Реакционная среда содержала 40 мМ раствор  $\text{H}_2\text{O}_2$  в 0.1М К/Na-фосфатном буфере (рН = 7.0). Реакции запускали добавлением 60 мкл супернатанта. Активность ферментов рассчитывали на мг белка. Общее содержание белка определяли по методу Бредфорда, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (Bradford, 1976).

Для изучения экспрессии генов антиоксидантных ферментов были выбраны гены *Cu/ZnSOD* (номер в NCBI KP322572), *FeSOD* (JX398977) и *CAT1* (X94352). Накопление транскриптов генов анализировали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Листья растирали в жидком азоте. Тотальную РНК выделяли с помощью набора ExtractRNA «Синтол» (Россия). Количество и качество тотальной РНК проверяли спектрофотометрически на приборе SmartSpec Plus «Био-Рад» (США) по соотношению длин волн 260/280 и с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Для удаления остатков ДНК препарат РНК обрабатывали ДНКазой «Синтол» (Россия). кДНК синтезировали, используя набор для обратной транскрипции с M-MLV обратной транскриптазой и случайными (random) гексапраймерами «Евроген» (Россия). В качестве референсного гена использовали актин. Количество и качество синтезированной кДНК проверяли

спектрофотометрически на приборе SmartSpec Plus «Био-Рад» (США). (Livak, Schmittgen, 2001). Праймеры, использованные для проведения ПЦР в режиме реального времени, представлены в табл. 1.

Биологическая повторность для показателей роста составляла 12 растений в каждом варианте опыта, при изучении биохимических показателей – 3–4-кратная, при проведении ПЦР – 2-кратная. Аналитическая повторность 2–3-кратная. Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета статистического анализа в Microsoft Office Excel 2007 и PAST 4.0. Статистически значимо различающиеся между собой величины каждого показателя (при  $P < 0.05$ ) на рисунках и в таблицах обозначены разными латинскими буквами.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенное исследование показало, что при дефиците цинка в корнеобитаемой среде задержки роста побега у изученных образцов пшеницы, независимо от аллельного статуса гена *GPC-B1*, не происходило. При этом наибольшая высота побега и его сырая биомасса как при оптимальном содержании цинка ( $\text{Zn } 2$ ), так и при его дефиците ( $\text{Zn } 0$ ) отмечались у растений линии 15-7-1 (табл. 2).

Поддержание роста растений в условиях недостатка цинка на уровне контроля отчасти объясняется сохранением окислительно-восстановительного равновесия в клетках, о чем свидетельствует отсутствие в опытных вариантах повышения (по сравнению с соответствующими контрольными вариантами) содержания МДА в листьях у пшеницы (рис. 1). Вместе с тем между образцами обнаружались определенные различия в величине этого показателя. Так, у растений линии 15-7-1 содержание МДА, независимо от содержания

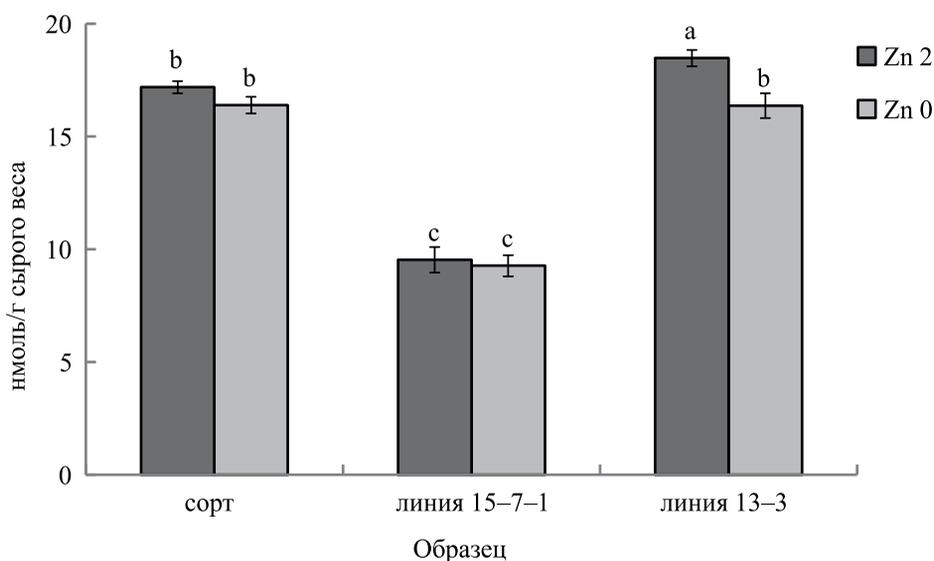
**Таблица 1.** Праймеры для проведения ПЦР-РВ у пшеницы

Ген	Прямой (F) и обратный (R) праймер	Нуклеотидная последовательность праймера 5'...3'	Номер в базе данных NCBI
Actin	F	GGG ACC TCACGGATAATCTAATG	AB181991
	R	AACCTCCACTGAGAACAACATTC	
Cu/ZnSOD	F	CACGGCTTCCACATCCAC	KP322572
	R	TGTCGTTTCATCATCCATCGG	
FeSOD	F	GGGTCTGGTTGGGTTTG	JX398977
	R	TCGCCTGTATCCTTGTAATC	
CAT1	F	TGATACCCAAAGGCACCG	X94352
	R	GCAGCCAGATAGAACACG	

**Таблица 2.** Показатели роста побега растений пшеницы с разным аллельным статусом гена *GPC-V1* в оптимальных условиях минерального питания и при дефиците цинка в корнеобитаемой среде

Показатель	Образец	Вариант опыта	
		Zn 2 (контроль)	Zn 0
Высота, см	Сорт	29.9 ± 1.0 c	32.4 ± 0.6 bc
	Линия 15-7-1	34.5 ± 1.0 ab	35.5 ± 0.6 a
	Линия 13-3	31.8 ± 1.1 bc	30.3 ± 1.5 c
Сырая биомасса, мг	Сорт	289.7 ± 31.3 bcd	353.3 ± 25.9 abc
	Линия 15-7-1	470.7 ± 47.5 a	397.8 ± 27.9 a
	Линия 13-3	275.1 ± 25.0 cd	251.0 ± 24.6 d
Сухая биомасса, мг	Сорт	37.1 ± 3.7 ab	44.4 ± 3.1 a
	Линия 15-7-1	46.9 ± 4.7 a	39.7 ± 3.1 a
	Линия 13-3	34.1 ± 3.3 bc	28.8 ± 1.1 c

Примечание. Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые различия между разными образцами и вариантами в пределах каждого показателя ( $P < 0.05$ ).



**Рис. 1.** Содержание МДА (нмоль/г сырого веса) в листьях растений пшеницы с разным аллельным статусом гена *GPC-V1* в оптимальных условиях минерального питания и при дефиците цинка в корнеобитаемой среде.

цинка, оказалось почти в 2 раза ниже, чем у растений сорта и линии 13-3.

Известно, что отсутствие в стрессовых условиях повышения интенсивности ПОЛ обеспечивается эффективной и согласованной работой компонентов антиоксидантной системы, в том числе антиоксидантных ферментов. Нами были обнаружены определенные различия в реакции изученных образцов пшеницы на стрессовое воздействие. Так, в условиях дефицита цинка у растений сорта общая активность СОД снижалась (на 21% по сравнению с контролем), а активность КАТ возрастала (на 24%) (табл. 3). У опытных растений линии 15-7-1 активность СОД также уменьшалась (на 25% по отношению к контролю), однако активность КАТ

оставалась на уровне контроля. У растений линии 13-3 недостаток цинка в субстрате не приводил к каким-либо изменениям в активности обоих ферментов. Отметим также, что растения этой линии характеризовались наиболее высокой активностью СОД и КАТ как при оптимальном, так и при низком содержании цинка в корнеобитаемой среде.

Одним из путей регуляции активности антиоксидантных ферментов в стрессовых условиях является изменение уровня экспрессии кодирующих их генов (Gill, Tuteja, 2010). Проведенная нами оценка количества транскриптов генов двух изоформ СОД (*Cu/ZnSOD* и *FeSOD*) и одной изоформы КАТ (*CAT1*) в листьях пшеницы показала, что при оптимальном уровне цинка (Zn 2) количество

**Таблица 3.** Активность антиоксидантных ферментов в листьях растений пшеницы с разным аллельным статусом гена *GPC-B1* в оптимальных условиях минерального питания и при дефиците цинка в корнеобитаемой среде

Образец	СОД		КАТ	
	Zn 2 (контроль)	Zn 0	Zn 2 (контроль)	Zn 0
Сорт	4.24 ± 0.24b	3.37 ± 0.13c	4.76 ± 0.32bc	5.91 ± 0.11a
Линия 15-7-1	4.87 ± 0.30ab	3.66 ± 0.16c	4.31 ± 0.22c	4.46 ± 0.09c
Линия 13-3	6.09 ± 0.52a	5.83 ± 0.38a	6.90 ± 0.25a	6.98 ± 0.63a

Примечание. Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые различия между разными образцами и вариантами в пределах каждого показателя ( $P < 0.05$ ). СОД – усл. ед. активности/мг белка, КАТ – мкмоль  $H_2O_2$ /мг белка·мин.

транскриптов изученных генов у растений изогенных линий, имеющих функциональный аллель гена *GPC-B1*, было в большинстве случаев выше, чем у растений сорта, имеющих его нефункциональную копию, за исключением содержания мРНК гена *Cu/ZnSOD* у линии 13-3 (рис. 2). При дефиците цинка (Zn 0) в среде у растений сорта наблюдалось снижение количества транскриптов гена *Cu/ZnSOD* (в 3.6 раза по отношению к контролю. В отличие от этого, у растений обеих изогенных линий (15-7-1 и 13-3) в этих условиях содержание транскриптов гена цинк-содержащей изоформы СОД возрастало (в 2.7 и 9 раз по сравнению с контролем соответственно) и оказалось выше, чем у сортового образца, в 7 и 1.6 раза соответственно (рис. 2). Содержание мРНК гена железосодержащей изоформы фермента у растений сорта в условиях дефицита цинка не менялось. У растений линии 15-7-1 оно резко снижалось (более чем в 3 раза по сравнению с контролем) и было почти в 2 раза ниже, чем у растений сорта в этих же условиях (рис. 2). У растений линии 13-3 недостаток цинка не оказывал сколько-нибудь существенного влияния на количество транскриптов гена *FeSOD*, однако при этом оно было в 2 раза выше, чем у сортовых растений.

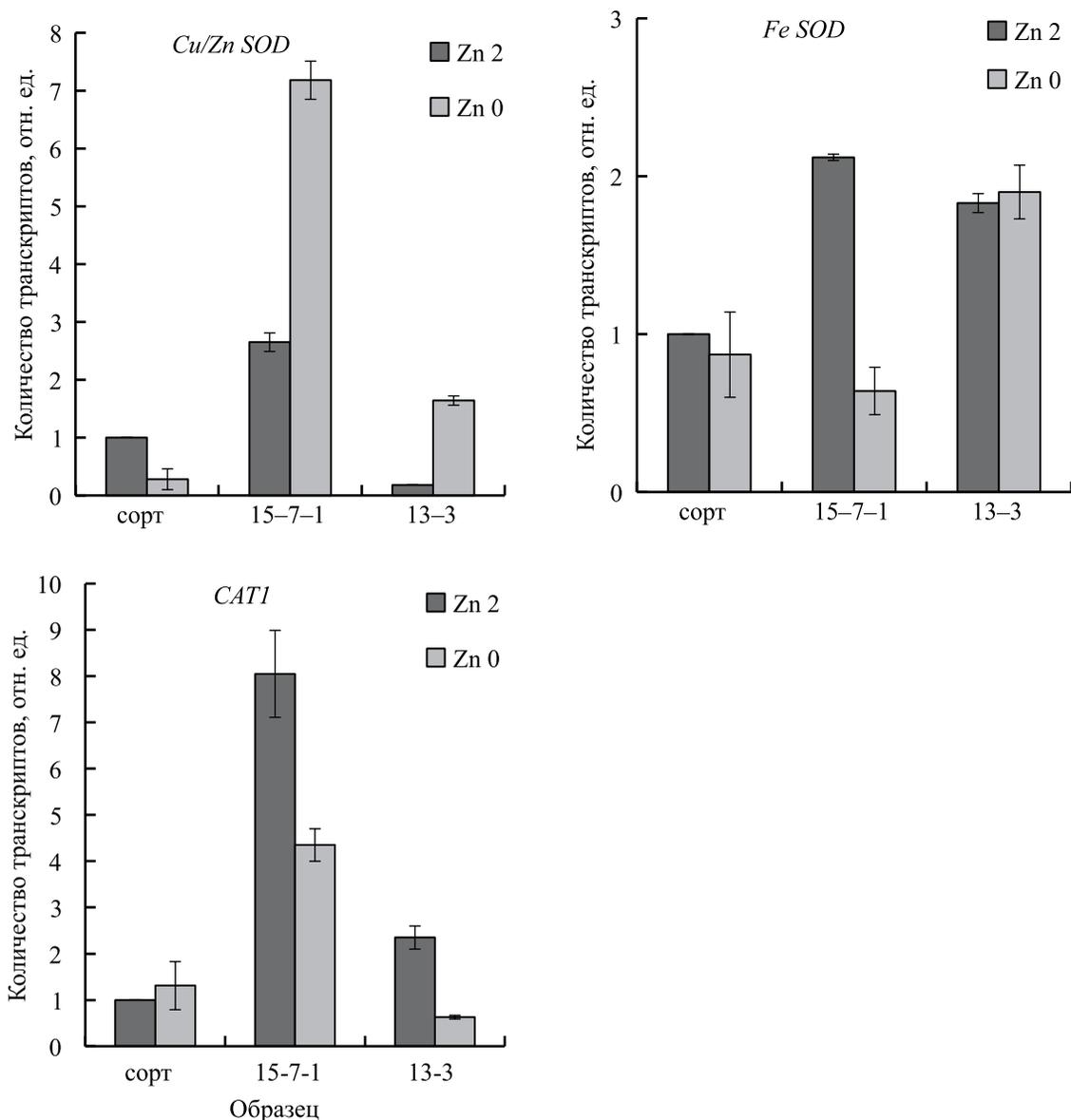
Что касается гена *CAT1*, то при дефиците цинка у растений сорта содержание его матриц существенно не менялось по сравнению с оптимальными условиями, тогда как у растений обеих линий значительно уменьшалось (рис. 2). При этом у растений линии 15-7-1 оно все равно оставалось начительно (в 4 раза) выше, чем у сорта, тогда как у растений линии 13-3 было почти в 2 раза ниже сортовых значений.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цинк является одним из наиболее важных микроэлементов, необходимых для протекания многих физиологических процессов у растений, поэтому его дефицит негативно сказывается на их росте и продуктивности (Rehman *et al.*, 2018).

Вместе с тем разные виды растений, а также сорта, линии или генотипы могут значительно различаться по устойчивости к этому виду стрессового воздействия. Устойчивость к дефициту цинка может быть определена на основе фенотипических характеристик, таких как параметры роста и выраженность межжилкового хлороза листьев (Genc *et al.*, 2002). Однако, судя по литературным данным, у злаков видимые симптомы дефицита цинка обычно возникают в случае его значительного и(или) длительного дефицита в растениях (Höller *et al.*, 2014a). Проведенное нами исследование показало, что, несмотря на очень низкое содержание цинка в питательном растворе, у опытных образцов пшеницы, независимо от функционального статуса аллеля гена *GPC-B1*, не наблюдалось существенного замедления роста, по крайней мере, в течение 14 сут экспозиции, что свидетельствует об их достаточно высокой устойчивости к дефициту этого микроэлемента.

Как известно, устойчивость растений к стресс-факторам во многом зависит от способности контролировать интенсивность окислительных процессов в клетках при действии неблагоприятных факторов внешней среды (Gill, Tuteja, 2010). В отношении дефицита цинка показано, что еще до появления видимых симптомов о его негативном влиянии на растения можно судить по интенсивности ПОЛ, одним из индикаторов которого является накопление МДА. Так, увеличение его содержания в условиях дефицита цинка наблюдалось в листьях пшеницы (Sharma *et al.*, 2004), кукурузы (Wang, Jin, 2007) и сорго (Li *et al.*, 2013). При этом в опытах с растениями гороха, риса, кукурузы обнаружено, что повышение уровня ПОЛ при дефиците цинка регистрируется только у чувствительных к этому стресс-фактору сортов, тогда как у устойчивых оно остается неизменным (Pandey *et al.*, 2012; Höller *et al.*, 2014a; Tewari *et al.*, 2019). В наших опытах у всех изученных образцов пшеницы в условиях дефицита цинка увеличения содержания МДА в листьях не происходило, что свидетельствует о сохранении про-антиоксидантного равновесия в клетках



**Рис. 2.** Количество транскриптов генов антиоксидантных ферментов в листьях растений пшеницы с разным аллельным статусом гена *GPC-B1* в оптимальных условиях минерального питания и при дефиците цинка в корнеобитаемой среде.

Примечание. За единицу принято количество транскриптов гена у растений сорта Фестивальная при оптимальном содержании цинка в корнеобитаемой среде.

и подтверждает высокую устойчивость растений к этому виду стрессового воздействия.

К настоящему времени установлено, что у растений имеются достаточно совершенные механизмы поддержания гомеостаза цинка в клетках, в широком диапазоне внешних концентраций этого металла. Так, в условиях дефицита цинка в среде на начальных этапах роста потребности растений в этом микроэлементе могут обеспечиваться за счет запасов цинка в семени. В дальнейшем поддержание нормальной жизнедеятельности во многом зависит от перестроек метаболизма,

направленных на более эффективное использование имеющихся запасов этого микроэлемента и увеличение способности противостоять развитию окислительного стресса в клетках в таких условиях (Höller *et al.*, 2014b). Последнее в значительной степени зависит от функционирования компонентов антиоксидантной системы, в том числе антиоксидантных ферментов. Функцию детоксикации АФК выполняют несколько ферментов, ключевыми среди которых являются СОД. Эта группа металлоферментов катализирует реакцию дисмутации супероксидных анион-радикалов,

поддерживая их концентрацию в клетке на низком уровне. В зависимости от иона металла в активном центре фермента различают несколько изоферментов СОД, среди которых наибольший вклад в общую активность ферментов носит Cu/Zn СОД (Gill *et al.*, 2015).

Полагают, что при дефиците цинка основной причиной развития окислительного стресса является уменьшение активности именно цинк-содержащей изоформы фермента, что было обнаружено у разных видов растений, в том числе у таких зерновых злаков, как пшеница (Сакмак *et al.*, 1997; Насисалиоглу *et al.*, 2003), ячмень, рожь (Сакмак *et al.*, 1998), кукуруза (Wang, Jin, 2007; Tewari *et al.*, 2019), рис (Chen *et al.*, 2008) и сорго (Li *et al.*, 2013). В наших опытах у растений сорта общая активность СОД снижалась, что согласуется с данными литературы. Поскольку у растений линии 13-3 активность фермента не менялась, можно было бы предположить, что это связано с присутствием у данной линии функционально активного гена, *GPC-B1*, способствующего более эффективной ремобилизации цинка из внутренних запасов. Однако у линии 15-7-1, также имеющей функциональный ген *GPC-B1*, при дефиците цинка наблюдалось снижение активности СОД.

Регуляция активности СОД, как и других ферментов, осуществляется в том числе за счет изменения экспрессии соответствующих генов. В геноме мягкой пшеницы в настоящее время идентифицировано 26 генов СОД, в том числе семнадцать Cu/Zn-СОД, шесть Fe-СОД и три Mn-СОД (Jiang *et al.*, 2019). Однако имеются лишь единичные работы, в которых изучена экспрессия всех генов СОД пшеницы при действии стресс-факторов. Так, при засолении и засухе из восьми случайно выбранных генов СОД на изученные виды стресса реагировали все гены, но характер реакции был различным (Jiang *et al.*, 2019).

В отношении активности генов СОД в условиях дефицита цинка данных в литературе сравнительно немного, и они весьма противоречивы. Например, у растений арабидопсиса и сои наблюдалось снижение уровня экспрессии генов *Cu/ZnSOD* в условиях недостатка цинка (Campos *et al.*, 2017; Zeng *et al.*, 2019). У сорго (Li *et al.*, 2013) и у Zn-эффективного сорта пшеницы (Насисалиоглу *et al.*, 2003) при дефиците цинка количество транскриптов генов, кодирующих Cu/ZnСОД, наоборот, возрастало. В литературе имеются также данные об усилении при дефиците цинка синтеза другой изоформы СОД – FeСОД, например в листьях картофеля (Cheng *et al.*, 2019) и кукурузы (Tewari *et al.*, 2019), что рассматривается как компенсаторная реакция на снижение количества цинк-содержащей изоформы фермента. Однако другими авторами на растениях сои показано, что недостаток цинка

приводит к снижению количества транскриптов гена *FeSOD* (Zeng *et al.*, 2019).

В наших опытах у растений с нефункциональным аллелем гена *GPC-B1* (сорт) в условиях дефицита цинка уровень экспрессии изученного нами гена *Cu/ZnSOD* уменьшался, что согласуется с результатами других исследователей (Campos *et al.*, 2017; Zeng *et al.*, 2019). У растений с функциональным аллелем гена *GPC-B1* (линии 15-7-1 и 13-3) количество транскриптов гена *Cu/ZnSOD* возрастало. Общая же активность СОД у растений линии 13-3 не менялась, а у линии 15-7-1 снижалась. Хотя показано, что цинк-содержащая изоформа СОД, как правило, вносит наибольший вклад в общую активность фермента, в определенных условиях роль других изоформ фермента может значительно возрасти (Ван и др., 2016). Так, у растений линии 13-3 поддержание стабильного уровня общей активности СОД наблюдалось на фоне повышения экспрессии *Cu/ZnSOD* при сохранении высокого содержания транскриптов гена *FeSOD*. У линии же 15-7-1 увеличение количества транскриптов *Cu/ZnSOD* сопровождалось уменьшением уровня экспрессии гена *FeSOD*, что могло привести к уменьшению количества молекул соответствующего белка и активности СОД в целом. Однако, если учесть отсутствие у растений линии 15-7-1 признаков развития окислительного стресса, снижение активности СОД, по-видимому, компенсировалось за счет функционирования других компонентов антиоксидантной системы, участвующих в нейтрализации супероксид радикала, таких, например, как аскорбат и глутатион (Höller *et al.*, 2014b).

Есть также данные о том, что паттерны экспрессии разных генов СОД могут меняться в зависимости от внутренней и внешней доступности ионов соответствующих металлов (Nagae *et al.*, 2008). Например, в условиях дефицита железа наблюдалось подавление экспрессии гена *FeSOD* (Kim *et al.*, 1999), а в условиях дефицита Cu – гена *Cu/ZnSOD* (Xu *et al.*, 2009). В рамках данного исследования нами не проводился анализ содержания ионов цинка, железа или меди в листьях пшеницы, однако, учитывая данные литературы о том, что наличие функционального аллеля *GPC-B1* влияет на экспрессию генов транспортных белков, таких, например, как ZIP1/15 (Deshpande *et al.*, 2018) или HMA2 (Kaznina *et al.*, 2022), можно предположить, что изученные линии пшеницы различаются по количеству и (или) эффективности использования физиологически доступного цинка, железа или меди, как это показано для Zn-эффективных и Zn-неэффективных генотипов пшеницы (Насисалиоглу *et al.*, 2003).

Существуют также данные, свидетельствующие о том, что экспрессия гена *FeSOD* увеличивается в ответ на повышение уровня радикалов кислорода в хлоропластах (Ван и др., 2016). Принимая во внимание данные о том, что дефицит цинка по-разному

влияет на фотосинтетические процессы у образцов пшеницы, различающихся аллельным состоянием гена *GPC-B1* (Игнатенко и др., 2021), можно предположить, что изменение уровня экспрессии гена *FeSOD* могло зависеть от того, насколько сильное негативное влияние дефицит цинка оказывал на процессы, протекающие в хлоропластах.

Не исключено также, что причины различий в реакции изученных линий пшеницы на дефицит цинка могут быть связаны с выбором для исследования конкретных генов СОД, что, однако, требует дополнительной проверки.

Анализ литературы показывает, что одновременно с уменьшением активности СОД при дефиците цинка происходит накопление в клетках перекиси водорода и возрастает активность ферментов, участвующих в ее нейтрализации (Chen *et al.*, 2008; Hajiboland, Amirazad, 2010; Tewari *et al.*, 2019). Изменение активности ферментов, участвующих в детоксикации перекиси водорода, имеет важное значение как для сохранения активности СОД, которая достаточно чувствительна к избытку пероксида, так и для поддержания окислительно-восстановительного баланса клеток в целом (Gill *et al.*, 2015). КАТ является наиболее эффективным ферментом с точки зрения удаления перекиси, поскольку нейтрализует ее с высокой скоростью и при этом, в отличие от пероксидаз, не требует наличия восстановителей. Увеличение активности КАТ в ответ на действие дефицита цинка ранее было обнаружено у растений риса (Chen *et al.*, 2008), капусты (Hajiboland, Amirazad, 2010), кукурузы (Tewari *et al.*, 2019) и др. В листьях чая, помимо увеличения общей активности КАТ при недостатке цинка в среде, обнаружена более высокая экспрессия гена *Cat* (Mukhopadhyay *et al.*, 2013). В настоящем исследовании у растений сорта, имеющих в составе генома нефункциональный аллель гена *GPC-B1*, активность КАТ при дефиците цинка возрастала, но увеличения количества транскриптов гена *CAT1* в листьях не наблюдалось. У растений изогенных линий (15-7-1 и 13-3) дефицит цинка не вызывал повышения активности КАТ, а содержание мРНК гена *CAT1* было даже ниже, чем в оптимальных условиях минерального питания, что наиболее отчетливо проявилось у линии 13-3. Увеличение общей активности КАТ у сорта могло быть вызвано повышением уровня пероксида водорода в клетках. Однако поскольку увеличения экспрессии гена *CAT1* не наблюдалось, можно предположить, что это повышение было относительно небольшим, не требующим усиления синтеза молекул фермента. Не исключено, что повышение активности КАТ могло быть вызвано накоплением пролина, который влияет на активность фермента, что наблюдалось, например, у растений овса при дефиците цинка (Елькина, 2020). Снижение же количества матриц

гена *CAT1* у интрогрессивных линий пшеницы в условиях дефицита цинка может объясняться нормализацией окислительно-восстановительного баланса клеток, что согласуется с низким уровнем ПОЛ. Кроме того, поскольку КАТ использует в качестве субстрата  $H_2O_2$ , которая функционирует и как сигнальная молекула, подавление экспрессии генов КАТ и, как следствие, повышение содержания перекиси водорода могут быть необходимы для усиления экспрессии генов, связанных со стрессовым ответом, и активизации дополнительных защитных механизмов (Orendi *et al.*, 2001).

В результате проведенного исследования выявлено, что у растений пшеницы сорта Фестивальная в условиях дефицита цинка наблюдается уменьшение количества транскриптов изученного нами гена *Cu/ZnSOD* и снижение общей активности СОД. В отличие от этого, у растений обеих изогенных линий в таких условиях количество транскриптов этого гена значительно увеличивалось, что, возможно, объясняется более эффективным использованием цинка растениями с функциональным аллелем гена *GPC-B1*. Тем не менее повышение экспрессии гена *Cu/ZnSOD* у растений не приводило к усилению общей активности СОД. Ее высокий уровень сохранялся в условиях дефицита цинка только у растений линии 13-3 и коррелировался с поддержанием более высокой экспрессии гена *FeSOD*.

В целом, изученные образцы мягкой пшеницы, независимо от функционального состояния аллеля гена *GPC-B1*, оказались устойчивыми к недостатку цинка в корнеобитаемой среде, о чем свидетельствует их способность поддерживать окислительно-восстановительный баланс клеток, а также сохранять рост и накопление биомассы побега в таких условиях. Полученные данные свидетельствуют также о значительном разнообразии путей поддержания окислительно-восстановительного баланса в условиях дефицита цинка у гибридов пшеницы, имеющих функциональный аллель гена *GPC-B1*. Это предполагает возможность отбора среди них линий, наиболее устойчивых к дефициту этого микроэлемента, с целью создания сортов, способных к формированию зерна с высоким содержанием цинка даже при выращивании в условиях его дефицита в почве.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (тема FMEN-2022-0004) и при поддержке РФФИ (грант Бел\_а № 20-516-00016) и БРФФИ (грант № Б20Р-240).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## БИОЭТИКА

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ван В., Ся М.К., Чэнь Дж., Юань Р., Дэн Ф.Н., Шэнь Ф.Ф. Особенности генной экспрессии и механизмы регуляции супероксиддисмутазы, ее физиологическая роль при стрессе // Биохимия. 2016. Т. 81. С. 625–643.
- Елькина Г.Я. Влияние различного содержания цинка в почве на аминокислотный состав биомассы кормовых трав // Агробиохимия. 2020. № 4. С. 57–65. DOI: 10.31857/S0002188120040043
- Игнатенко А.А., Казнина Н.М., Батова Ю.В., Дубовец Н.И. Ответная реакция растений пшеницы с разным аллельным состоянием гена *GPC-V1* на дефицит цинка в субстрате // Труды Карельского научного центра РАН. 2021. № 11. С. 103–112. <http://dx.doi.org/10.17076/eb1502>
- Митрофанова О.П., Хакимова А.Г. Новые генетические ресурсы в селекции пшеницы на увеличение содержания белка в зерне // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016 Т. 20. № 4. С.545–554. DOI: 10.18699/VJ16.177
- Aebi H. Catalase in vitro // Method Enzymol. 1984. V. 105. P. 121–126. DOI:10.1016/s0076-6879(84)05016-3
- Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Analytical Biochemistry. 1971. V. 44. P. 276–287. DOI:10.1016/0003-2697(71)90370-8
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254. DOI:10.1006/abio.1976.9999
- Cakmak I. Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species // New Phytol. 2000. V. 146. P. 185–205. DOI:10.1046/j.1469-8137.2000.00630.x
- Cakmak I., Marschner H. Effect of zinc nutritional status on activities of superoxide radical and hydrogen peroxide scavenging enzymes in bean leaves // Plant nutrition from genetic engineering to field practice / N.J. Barrow (Ed.). 1993. Kluwer Academic Publishers. P. 133–137. <https://doi.org/10.1007/BF00025000>
- Cakmak I., McLaughlin M.J., White P. Zinc for better crop production and human health // Plant Soil. 2017. V. 411. P. 1–4. DOI: 10.1007/s11104-016-3166-9
- Cakmak I., Öztürk L., Eker S., Torun B., Kalfa H.I., Yilmaz A. Concentration of zinc and activity of copper/zinc-superoxide dismutase in leaves of rye and wheat cultivars differing in sensitivity to zinc deficiency // J. Plant Physiol. 1997. V. 151. P. 91–95.
- Cakmak I., Torun B., Erenoğlu B., Öztürk L., Marschner H., Kalayci M., Ekiz H., Yilmaz A. Morphological and physiological differences in the response of cereals to zinc deficiency. // Euphytica. 1998. V. 100. P. 349–357.
- Campos A.C.A.L., Kruijer W., Alexander R., Akkers R.C., Danku J., Salt D.E., Aarts M.G.M. Natural variation in *Arabidopsis thaliana* reveals shoot ionome, biomass, and gene expression changes as biomarkers for zinc deficiency tolerance // J. Exp. Bot. 2017. V. 68. P. 3643–3656. DOI: 10.1093/jxb/erx191
- Chen W., Yang X., He Z., Feng Y., Hu F. Differential changes in photosynthetic capacity, 77 K chlorophyll fluorescence and chloroplast ultrastructure between Zn-efficient and Zn-inefficient rice genotypes (*Oryza sativa*) under low zinc stress // Physiologia Plantarum. 2008. V. 132. P. 89–101. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2007.00992.x
- Cheng L., Zhang S., Yang L., Wang Y., Yu B., Zhang F. Comparative proteomics illustrates the complexity of Fe, Mn and Zn deficiency responsive mechanisms of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants in vitro // Planta. 2019. V. 250. P. 199–217. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03163-w>
- Deshpande P., Dapkekar A., Oak M., Paknikar K. Nano-carrier-mediated foliar zinc fertilization influences expression of metal homeostasis related genes in flag leaves and enhances gluten content in durum wheat // PLOS ONE. 2018. V. 13. № 1. P. e0191035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191035>
- Genc Y., McDonald G.K. The potential of synthetic hexaploid wheats to improve zinc efficiency in modern bread wheat // Plant and Soil. 2004. V. 262. P. 23–32/
- Genc Y., McDonald G.K., Graham R.D. A soil-based method to screen for zinc efficiency in seedlings and its ability to predict yield responses to zinc deficiency in mature plants // Aust. J. Agric. Res. 2002. V. 53. P. 409 – 421. DOI:10.1071/AR01088
- Gill S.S., Anjum N.A., Gill R., Yadav S., Hasanuzzaman M., Fujita M., Mishra P., Sabat S.C., Tuteja N. Superoxide dismutase – mentor of abiotic stress tolerance in crop plants // Environ. Sci. Pollut. Res. 2015. V. 22. P. 10375 – 10394. DOI: 10.1007/s11356-015-4532-5
- Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // Plant Physiol. Biochem. 2010. V. 48. P. 909–930. DOI:10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Guzman C., Medina-Larque A.S., Velu G., Gonzalez-Santoyo H., Singh R.P., Huerta-Espino J.,

- Ortiz-Monasterio I., Pena R.J.* Use of wheat genetic resources to develop biofortified wheat with enhanced grain zinc and iron concentrations and desirable processing quality // *Journal of Cereal Science*. 2014. V. 60. P. 617–622.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2014.07.0060733-5210>
- Hacisalihoglu G., Hart J.J., Wang Y-H., Cakmak I., Kochian L.V.* Zinc efficiency is correlated with enhanced expression and activity of zinc-requiring enzymes in wheat // *Plant Physiol*. 2003. V. 131. P. 595–602.  
[www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.011825](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.011825)
- Hajiboland R., Amirazad F.* Growth, photosynthesis and antioxidant defense system in Zn-deficient red cabbage plants // *Plant Soil Environ*. 2010. V. 56. P. 209–217.  
 DOI: 10.17221/207/2009-PSE
- Heath R.L., Packer L.* Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // *Arch. Biochem. Biophys*. 1968. V. 125. P. 189–198.  
 DOI: 10.1016/0003-9861(68)90654-1
- Höller S., Hajirezaei M-R., von Wirén N., Frei M.* Ascorbate metabolism in rice genotypes differing in zinc efficiency // *Planta*. 2014a. V. 239. P. 367–379.  
 DOI: 10.1007/s00425-013-1978-x
- Höller S., Meyer A., Frei M.* Zinc deficiency differentially affects redox homeostasis of rice genotypes contrasting in ascorbate level // *J. Plant Physiol*. 2014b. V. 171. P. 1748–1756.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2014.08.012>
- Jiang W., Yang L., He Y., Zhang H., Li W., Chen H., Ma D., Yin J.* Genome-wide identification and transcriptional expression analysis of superoxide dismutase (SOD) family in wheat (*Triticum aestivum*) // *Peer J*. 2019. V. 7: e8062  
<https://doi.org/10.7717/peerj.8062>
- Kaznina N.M., Dubovets N.I., Repkina N.S., Batova Y.V., Ignatenko A.A., Orlovskaya O.A., Titov A.F.* The *HMA2* gene expression in leaves of introgressive wheat lines under Zn optimum and deficiency content in root environment // *Doklady biochemistry and biophysics*. 2022. V. 505. P. 141–144.  
 DOI:10.1134/S1607672922040056
- Kim Y. C., Miller C. D., and Anderson A. J.* Transcriptional regulation by iron of genes encoding iron and manganese superoxidodismutases from *Pseudomonas putida* // *Gene*. 1999. V. 239. P. 129–135.  
 DOI: 10.1016/s0378-1119(99)00369-8
- Li Y., Zhang Y., Shi D., Liu X., Qin J., Ge Q., Xu L., Pan X., Li W., Zhu Y., Xu J.* Spatial-temporal analysis of zinc homeostasis reveals the response mechanisms to acute zinc deficiency in *Sorghum bicolor* // *New Phytol*. 2013. V. 200. P. 1102–1115.  
 DOI: 10.1111/nph.12434
- Livak K.J., Schmittgen T.D.* Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method // *Methods*. 2001. V. 25. P. 402–408.  
 DOI:10.1006/meth.2001.1262
- Marschner H.* Mineral nutrition of higher plants. 1995. London: Academic Press. 889 p.
- Mukhopadhyay M., Das A., Subba P., Bantawa P., Sarkar B., Ghosh P., Mondal T.K.* Structural, physiological, and biochemical profiling of tea plants under zinc stress // *Biologia Plantarum*. 2013. V. 57. P. 474–480.  
 DOI: 10.1007/s10535-012-0300-2
- Nagae M., Nakata M., Takahashi Y.* Identification of Negative cis-Acting Elements in Response to Copper in the Chloroplastic Iron Superoxide Dismutase Gene of the Moss *Barbula unguiculata* // *Plant Physiol*. 2008. V. 146. P. 1687–1696.  
 DOI:10.1104/pp.107.114868
- Orendi G., Zimmermann P., Baar C., Zentgraf U.* Loss of stress-induced expression of catalase3 during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* is restricted to oxidative stress // *Plant Science*. 2001. V. 161. P. 301–314.  
 DOI:10.1016/s0168-9452(01)00409-5
- Pandey N., Gupta B., Pathak G.C.* Antioxidant response of pea genotypes to zinc deficiency // *Физиология растений*. 2012. Т. 59. С. 225–231.  
 DOI:10.1134/S1021443712010141
- Rehman A., Farooq M., Ozturk L., Asif M., Siddique K.H.M.* Zinc nutrition in wheat-based cropping systems // *Plant Soil*. 2018. V. 422. P. 283–315.  
<https://doi.org/10.1007/s1104-017-3507-3>
- Saini P., Kaur H., Tyagi V., Yadav A.N., Saini P., Sharma V., Singh C., Dhaliwal H.S., Sheikh I.* Genetic enhancement of nutritional and end-use quality in bread wheat through alien introgressions from wild relatives // *Cereal Research Communications*. 2023. V. 51. P. 295–314.  
<https://doi.org/10.1007/s42976-022-00309-7>
- Sharma P.N., Kumar P., Tewari R.K.* Early signs of oxidative stress in wheat plants subjected to zinc deficiency // *J. Plant Nutr*. 2004. V. 27. P. 451–463.  
 DOI:10.1081/PLN-120028873
- Tabbita F., Pearce S., Barneix A.J.* Breeding for increased grain protein and micronutrient content in wheat: Ten years of the GPC-B1 gene // *Journal of Cereal Science*. 2017. V. 73. P. 183–191.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2017.01.003>
- Tewari R.K., Kumar P., Sharma P.N.* An effective antioxidant defense provides protection against zinc deficiency-induced oxidative stress in Zn-efficient maize plants // *J. Plant Nutr. Soil Sci*. 2019. V. 182. P. 701–707.  
 DOI:10.1002/jpln.201800622
- Uauy C., Distelfeld A., Fahima T., Blechl A., Dubcovsky J.* A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc and iron content in wheat // *Science*. 2006. V. 314. P. 1298–1300.  
 DOI: 10.1126/science.1133649
- Velu G., Herrera L.C., Guzman C., Huerta J., Payne T., Singh R.P.* Assessing Genetic Diversity to Breed Competitive Biofortified Wheat With Enhanced Grain Zn and Fe Concentrations // *Front. Plant Sci*. 2019. V. 9.1971.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01971>
- Velu G., Ortiz-Monasterio I., Cakmak I., Hao Y., Singh R.P.* Biofortification strategies to increase grain zinc and

- iron concentrations in wheat // *J. Cereal Sci.* 2014. V. 59. P. 365–372.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.09.001>
- Vishwakarma M.K., Mishra V.K., Gupta P.K., Yadav P.S., H. Kumar, Joshi A.K.* Introgression of the high grain protein gene *Gpc-B1* in an elite wheat variety of Indo-Gangetic Plains through marker assisted backcross breeding // *Current Plant Biology*. 2014. V. 1. P. 60–67.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cpb.2014.09.003>
- Wang H., Jin J.* Effects of zinc deficiency and drought on plant growth and metabolism of reactive oxygen species in maize (*Zea mays* L.) // *Agric. Sci. China*. 2007. V. 6. P. 988–995.  
 DOI:10.1016/S1671-2927(07)60138-2
- Waters B.M., Uauy C., Dubcovsky J., Grusak M.A.* Wheat (*Triticum aestivum*) NAM proteins regulate the translocation of iron, zinc, and nitrogen compounds from vegetative tissues to grain // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. P. 4263–4274.  
 DOI:10.1093/jxb/erp257
- WHO. The World Health Report // Geneva: World Health Organization. 2017.
- Xu J., Tian Y. S., Peng R. H., Xiong A. S., Zhu B., Jin X. F., Gao J. J., Hou X. L., and Yao Q. H.* Yeast copper-dependent transcription factor ACE1 enhanced copper stress tolerance in *Arabidopsis* // *BMB Rep.* 2009. V. 42. P. 752–757.  
<https://doi.org/10.5483/BMBRep.2009.42.11.752>
- Zeng H., Zhang X., Ding M., Zhang X., Zhu Y.* Transcriptome profiles of soybean leaves and roots in response to zinc deficiency // *Physiol. Plant.* 2019. V. 167. P. 330–351.  
 DOI:10.1111/ppl.12894

## Activity of antioxidant enzymes and expression of the genes encoding them in leaves of wheat plants with different allelic status of the *GPC-B1* gene with optimal zinc content in the environment and its deficiency

Yu. V. Batova<sup>#</sup>, N. S. Repkina, A. A. Ignatenko, N. M. Kaznina

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

<sup>#</sup>E-mail: batova.krc@mail.ru

It has been shown that the studied variants of bread wheat plants are resistant to zinc deficiency in substrate. Various ways of adaptation to these conditions by the antioxidant system have been discovered in plants that have a functional allele of the *GPC-B1* gene. Thus, in plants of line 15-7-1, the maintain of the redox balance of cells is associated with an increase in the expression of the *Cu/ZnSOD* gene and a decrease in the expression of the *FeSOD* and *CAT1* genes, whereas in plants of line 13-3, in addition to an increase in the transcripts content of the *Cu/ZnSOD* gene, with a high constitutive activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). The data obtained can be used to create wheat varieties (lines) capable of producing seeds with a relatively high content of zinc under zinc deficiency in the soil.

*Keywords:* wheat, zinc deficiency, *GPC-B1* gene, growth, superoxide dismutase, catalase

УДК [594.3-15:[57.043:536]](262.5)

## ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ВОДЫ НА РАЗМЕРНО-ВОЗРАСТНОЙ СОСТАВ, ЧИСЛЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ ЧЕРНОМОРСКИХ МОЛЛЮСКОВ *HYDROBIA ACUTA* И ЗАРАЖЕННОСТЬ ИХ ПАРТЕНИТАМИ ТРЕМАТОД *GYNAECOTYLA ADUNCA*

© 2024 г. Ю. В. Белоусова<sup>®</sup>, М. В. Макаров, А. М. Лях

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр  
«Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН», пр. Нахимова, 2, Севастополь, 299011 Россия  
<sup>®</sup>e-mail: julls.belousova@gmail.com

Поступила в редакцию 22.12.2023 г.

После доработки 09.06.2024 г.

Принята к публикации 10.06.2024 г.

В статье выполнен анализ влияния температуры воды на размеры, численность популяции моллюсков *Hydrobia acuta* и их зараженность партенитами трематод *Gynaecotyla adunca* в бухте Казачьей (Черное море). Выявлено, что изменение температуры объясняет около 60% изменчивости экстенсивности инвазии и около 30% изменчивости численности моллюсков. Установленные корреляционные зависимости могут быть использованы для приближенной оценки влияния температуры воды на показатели численности популяции моллюсков и их зараженности партенитами трематод в черноморской акватории.

**Ключевые слова:** моллюски, *Hydrobia acuta*, трематоды, партениты, *Gynaecotyla adunca*, температура воды

**DOI:** 10.31857/S1026347024060085, **EDN:** ukosnm

Бухта Казачья расположена на юго-западном побережье Крымского полуострова и свободно прилегает к открытой части Черного моря. Бухта является примером черноморской акватории, которая на протяжении долгих десятилетий относилась к наименее загрязненным бухтам Севастополя, являясь одноименным государственным природным заказником (Миронов, 2002; Котельянц и др., 2017).

Изучение паразитов гидробионтов, обитающих в морских экосистемах заказников и заповедников Крымского побережья Черного моря, ведется с начала прошлого века. Наибольшее внимание было уделено паразитофауне рыб Карадагского природного заповедника, Орнитологического филиала Крымского природного заповедника международного значения «Лебяжьих острова» и частично акватории прибрежно-аквального комплекса заказника «Бухта Казачья» (Дмитриева и др., 2009; Пронькина, Полякова, 2013). Однако исследования по влиянию абиотических факторов, в частности температуры, на зараженность черноморских моллюсков в бухте Казачьей ранее не проводились.

На рыхлых грунтах вершины бухты Казачьей наиболее многочисленным видом брюхоногих моллюсков признан *Hydrobia acuta* (Draparnaud, 1805) (Макаров, 2020), а наиболее часто встречающимся видом трематод у этих гастропод зарегистрирован *Gynaecotyla adunca* (Linton, 1905) (Yamaguti, 1939) (Belousova, 2022).

В настоящем исследовании была поставлена цель изучить влияние температуры воды на размеры, численность популяции моллюсков *Hydrobia acuta* и на их зараженность партенитами трематод *Gynaecotyla adunca* в одной из наименее загрязненных бухт Крымского полуострова.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Отбор проб моллюсков проводили с рыхлых песчаных грунтов с августа 2011 г. по июль 2012 г. ежемесячно в бухте Казачьей на станции с координатами 44° 34' 21.4» с. ш., 33° 24' 15.2" в. д. (рис. 1), в двух повторностях, на глубине 0.1 м с помощью ручного дночерпателя Петерсена (площадь захвата – 0.04 м<sup>2</sup>). Одновременно

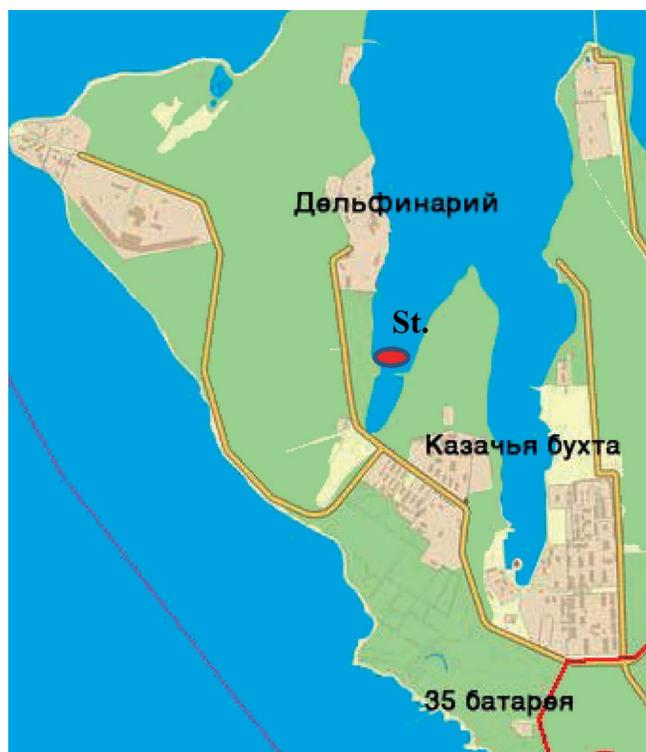


Рис. 1. Карта отбора проб брюхоногих моллюсков *Hydrobia acuta*. St. — точка отбора проб.

на этой же глубине погружным термометром измеряли температуру воды ( $^{\circ}\text{C}$ ).

В лаборатории грунт промывали через сито размером ячеей 0.5 мм и отбирали моллюсков *H. acuta*. Далее подсчитывали численность (экз.) на единицу площади дна ( $\text{м}^2$ ) и измеряли высоту их раковины с помощью штангенциркуля или окуляр-микрометра.

Для гельминтологических исследований моллюсков в течение 10 дней содержали в кристаллизаторах объемом 200 мл. Морскую нефiltroванную воду в кристаллизаторах меняли один раз в 2–3 дня.

Моллюсков исследовали на наличие гельминтов под микроскопом МБС-10 компрессорным методом (Быховская-Павловская, 1969) при увеличении  $\times 98$ . Всего исследовано 890 экземпляров. Далее рассчитывали экстенсивность инвазии моллюсков парthenитами трематод *Gynaecotyla adunca*.

Статистический анализ данных выполнен при помощи системы R.

Для оценки характера связей между параметрами популяции моллюсков (размер и численность особей), показателями инвазии парthenитами трематод (экстенсивность инвазии – ЭИ) и температурой воды вычислены коэффициенты корреляции Спирмана,  $\rho$  (функция cor.test стандартной библиотеки R). Достоверность корреляционных отношений проверена при 95% уровне значимости ( $p = 0.05$ ).

Для оценки достоверности различий между выделенными группами размеров популяции моллюсков в разные периоды года использован текст Краскелла–Уоллиса (функция kruskal.test стандартной библиотеки R). Для попарного сравнения групп использована процедура множественного сравнения после теста Краскелла–Уоллиса (функция kruskalmc из пакета pgrmess среды R).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В течение всего периода исследования моллюски *H. acuta* встречались в верхней части песчано-илистого грунта. В целом можно выделить

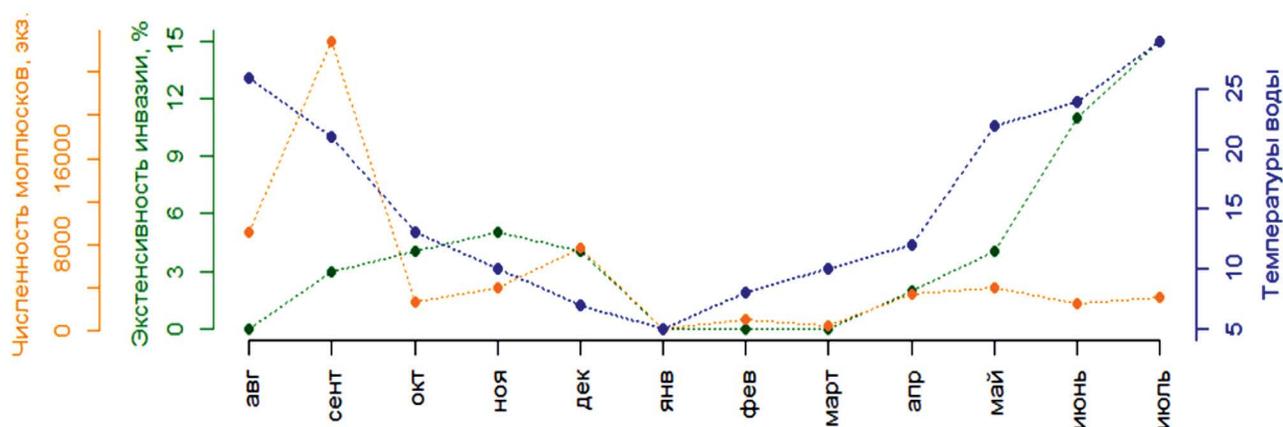


Рис. 2. Зависимость численности популяции гастропод *Hydrobia acuta* и показателей инвазий их дочерними парthenитами трематод *Gynaecotyla adunca* от температуры морской воды.

3 периода встречаемости моллюсков *H. acuta* в течение года (рис. 2): I период – с января по март, когда плотность популяции *H. acuta* оставалась очень низкой (период зимовки), II – с апреля по август, наблюдалось плавное повышение численности популяции *H. acuta*, III – пик численности моллюсков (сентябрь), связанный с появлением подростовой молодежи, которая возвращается к урезу воды. С октября наблюдается резкий спад численности популяции моллюсков.

Анализ размерной структуры популяции моллюсков *H. acuta*, представленный на рис. 3, показал, что для моллюсков можно выделить следующие размерные когорты: I – размер моллюсков 2–4 мм – появившаяся молодежь (преобладала с августа 2011 г. по январь 2012 г., в июне 2012 г.), II – моллюски средних размеров 5–6 мм – подрастающая молодежь (февраль–март), III – моллюски крупных размеров 6–12 мм – старшее поколение в период размножения (апрель–май) (рис. 3).

В ходе исследования установлено, что у моллюсков к моменту размножения размер раковин достигал не менее 6 мм. Период размножения исследуемых гидробий зарегистрирован с апреля по май с высоким процентом моллюсков III когорты, несущих яйцевые капсулы. Впоследствии появление моллюсков размером до 4 мм (I когорта) в июне показало, что в этот месяц происходило пополнение популяции моллюсков после периода размножения (рис. 3). В июле с повышением температуры воды наблюдается активный рост молодежи и увеличение размеров раковин моллюсков (4–6 мм), таким образом, мы отмечаем прямую положительную корреляцию между температурой воды и ростом моллюсков. В дальнейшем с августа по декабрь сохраняются

основные размерные характеристики популяции гидробий (размеры 2–6 мм) (рис. 3). В январе особи моллюсков мигрируют на глубину 1–2 м на зимовку.

В течение года в акватории бухты Казачья у моллюсков *H. acuta* зарегистрированы партениты микрофаллидной трематоды *G. adunca*, для которых проанализирована сезонная динамика их численности (рис. 2).

В изученном биотопе спороцисты *G. adunca* встречались в моллюсках *H. acuta* практически весь год. В сезонной динамике численности партенит *G. adunca* четко выделяются периоды массового заражения моллюсков, которые графически отображаются двумя пиками численности партенит – в июле и ноябре (рис. 2).

В бухте Казачьей с января по март мы не отметили зараженных партенитами *G. adunca* моллюсков *H. acuta* (экстенсивность инвазии – 0%). В апреле наблюдалась тенденция к плавному росту экстенсивности инвазии партенитами микрофаллид. Все моллюски, зараженные партенитами *Gynaecotyla*, в период с мая по июль содержали в гонадах значительное количество партенит. В августе доля партенит трематод резко падала из-за гибели старых особей моллюсков, а молодежь моллюсков еще не успела заразиться. В октябре зарегистрировано плавное увеличение численности партенит, что отображается вторым незначительным пиком заражения в ноябре.

При помощи корреляционного анализа мы выявили положительную корреляционную связь между показателями экстенсивности инвазии и численности моллюсков и температурой воды. Установлено, что показатели зараженности и численности моллюсков достоверно связаны

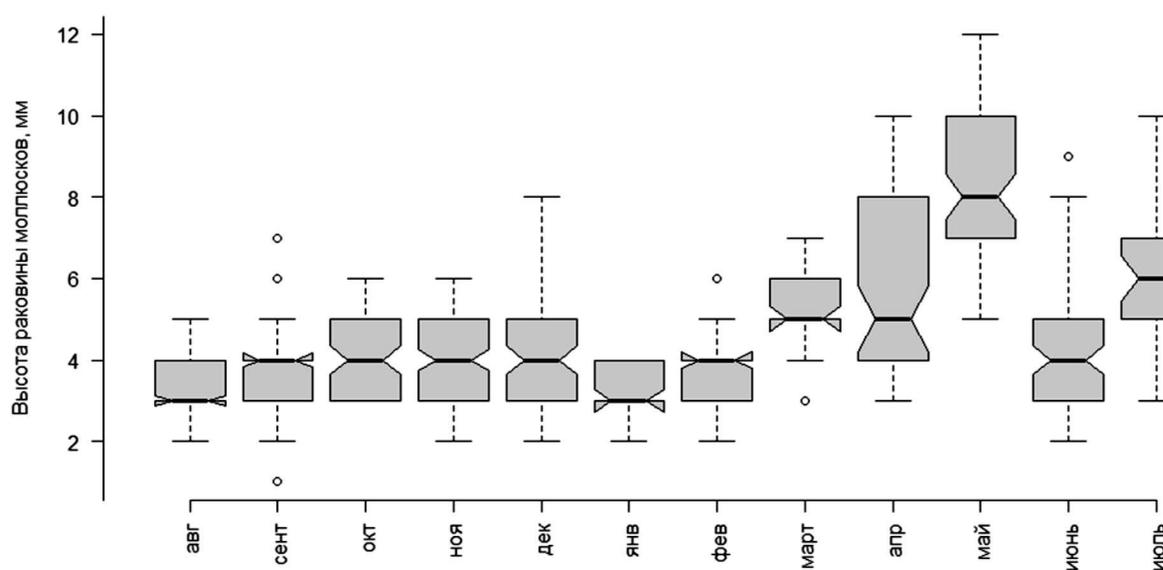


Рис. 3. Размерная структура популяции моллюсков *Hydrobia acuta* в 2011–2012 г.

с температурой воды не в текущий, а в предыдущий месяцы ( $t_{-1}$ ). Связь с температурой в текущий месяц была недостоверной.

$$\rho(\text{ЭИ}, t_{-1}) = 0.76, p = 0.007, \rho^2 = 0.58;$$

$$\rho(\text{числ.}, t_{-1}) = 0.53, p = 0.091, \rho^2 = 0.28.$$

Для того чтобы выявленная взаимосвязь стала более наглядной, мы разделили весь период наблюдений на три этапа со схожей тенденцией изменения температуры и рассмотрели размерную структуру популяции моллюсков в выделенные периоды (рис. 4). Тест Краскелла–Уоллиса показал наличие статистического значимого различия между размерами моллюсков в выделенных группах ( $p \ll 0.01$ ). Дальнейшее попарное множественное сравнение групп выборок показало, что отличия между всеми парами групп размеров моллюсков было достоверным. Таким образом, периоды годового цикла с достоверно различающейся размерной структурой популяции моллюсков выглядят так:

– период с постепенным понижением температуры воды (август – февраль); в популяции существенно преобладали мелкие раковины гастропод размером 3–4 мм, тогда как доля более крупных раковин (более 6 мм) была незначительной;

– стабильное плавное повышение температуры воды (март – май). Размеры раковин заметно

увеличились, и одновременно с этим размерная структура популяции выровнялась. В целом преобладали раковины размером 4–10 мм, тогда как доля более мелких раковин была ничтожной;

– период с высокой температурой воды (июнь – июль). В популяции преобладали более мелкие, молодые моллюски размером 2–6 мм, а более крупные начали постепенно умирать после периода размножения.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Жизненный цикл моллюсков семейства *Hydrobiidae* очень разнообразен как для разных видов этого семейства, так и для различных акваторий. Для моллюсков рода *Hydrobia* годовой ход температуры оказывает непосредственное влияние на процессы размножения и роста. В Северном и Балтийском морях проводились детальные исследования жизненных циклов двух видов моллюсков рода *Hydrobia*, однако для Черного и Средиземного моря описан жизненный цикл только моллюска *H. acuta*. В своей работе Р. Бриттон (1985) отмечает, что в Средиземном море молодые особи *H. acuta* начинают появляться в пробах в феврале–марте, а основное пополнение популяции моллюсков происходит с конца мая по июль. С середины июля в пробах Р. Бриттон регистрировал мертвых гастропод. Подростая весенняя молодежь сначала

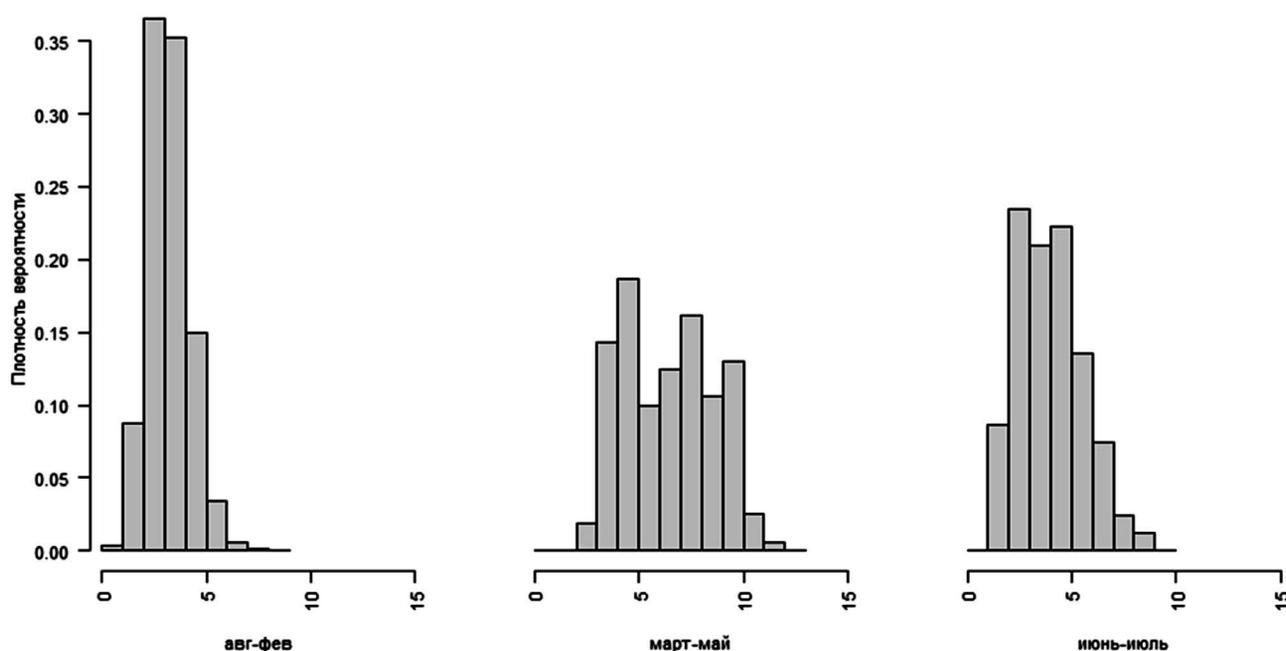


Рис. 4. Размерная структура популяции моллюсков в разные периоды годового цикла. По оси абсцисс – размеры раковин моллюсков в мм. По оси ординат – плотность вероятности. Это вероятность того, что размер раковины моллюска попадет в указанный диапазон значений.

росла медленно, затем показатели размера раковин моллюсков и численности их популяции увеличивались к концу лета и осени на фоне возрастающей температуры воды. К декабрю, по данным автора, рост моллюсков останавливался и особи мигрировали на глубину для зимовки. В.Д. Чухчин (1984) указывал, что размножение гидробий в Черном море, аналогично средиземноморскому бассейну, происходит в апреле – мае. Молодь гидробий появляется в июне и продолжает поступать в популяцию в течение лета. В конце осени преобладают моллюски нового поколения, мигрирующие в начале зимы на глубину 1–2 м (Чухчин, 1976). Моллюски старшей возрастной группы к этому времени уже погибают. В настоящем исследовании мы подтверждаем данные о том, что размножение черноморских *H. acuta* проходило с апреля по май, в июне происходило пополнение популяции моллюсков после периода размножения. В июле с повышением температуры воды наблюдалось плавное увеличение численности популяции моллюсков с пиком в сентябре, что обусловлено приростом популяции за счет развития молодых особей. В октябре с понижением температуры воды показатели численности моллюсков резко снижаются вплоть до минимальных показателей численности в январе, поскольку в этот период гидробии мигрируют на глубину для зимовки (Чухчин, 1976). Такой годовой цикл моллюсков *H. acuta* графически отображается в виде мономодальной кривой.

Сезонная динамика численности моллюсков *H. acuta* в бухте Казачьей в определенной степени связана с изменениями температуры воды (рис. 4). Так, минимальные показатели температуры воды (5°C) и средней численности моллюсков (163 экз./м<sup>2</sup>) зафиксированы в январе. Максимальные показатели значений температуры воды отмечены в июле (29°C) и августе (26°C), а численности гидробий – в сентябре (27401 экз./м<sup>2</sup>). Полученные данные отображают прямую положительную корреляцию между температурой и показателями численности моллюсков. Для сравнения, по нашим данным, в устье реки Черная (окрестности Севастополя) в 2011–2012 гг. пик численности *H. acuta* (39625 экз./м<sup>2</sup>) и экстенсивности инвазии *Cryptocotyle lingua* (около 20 %) был в августе при температуре воды 23°C (Белоусова и др., 2024 в печати).

Полученные коэффициенты детерминации ( $r^2$ ) показали, что изменение температуры объясняет около 60% изменчивости экстенсивности инвазии и около 30% изменчивости численности моллюсков. Таким образом, всего лишь треть изменчивости численности моллюсков связана с температурой в предыдущий месяц. В какой-то мере это подтверждает высказанную ранее гипотезу, основанную на исследованиях в другой черноморской акватории – эстуарии реки Черная (Белоусова и др., 2024, в печати)

о наличии отсроченной реакции изменения численности и экстенсивности инвазии моллюсков на температуру воды в Черном море.

По литературным данным, северный вид гидробий *Peringia* (= *Hydrobia*) *ulvae* (Pennat, 1777) живет до 2–3 лет, в то время как моллюск *Ecrobia* (= *Hydrobia*) *ventrosa* (Montagu, 1803) – от 1 до 1.5 лет (Kube *et al.*, 2002). Жизненный цикл исследованных в Черном море моллюсков *H. acuta* отличается от других видов рода *Hydrobia* тем, что является строго годовым с коротким периодом размножения (апрель – май). При этом черноморские гидробии достигают половой зрелости при небольших размерах до 10–12 мм в противовес крупным северным видам сем. *Hydrobiidae*. Полученные результаты согласуются с данными Р. Бриттона (1985), который отмечал, что в Средиземном море для *H. acuta* характерен годовой жизненный цикл, а период размножения у моллюсков наступает при незначительных размерах их раковин. Таким образом, жизненный цикл черноморских гидробий протекает аналогично циклу средиземноморских особей.

Заражение моллюсков *H. acuta* трематодами *G. adunca* варьировало на протяжении года. Максимальные показатели экстенсивности инвазии моллюсков *H. acuta* трематодой *G. adunca* приходятся на июль и ноябрь (рис. 2), с наименьшими показателями инвазии с января по март. Показатели экстенсивности инвазии партенитами моллюсков резко снижаются с января по март в связи с гибелью моллюсков старшей возрастной группы и уходом молоди на глубину для зимовки. Эти данные согласуются с данными других авторов, изучавших колебания численности партенит микрофаллидных трематод у моллюсков рода *Hydrobia* (Kube *et al.*, 2002). Мы предполагаем, что эти пики, с одной стороны, связаны с тем, что спороцисты *G. adunca* формируют микрогемипопуляции, самообновление состава которых происходит в течение года. На протяжении всего года мы отмечаем партенит со смешанным качественным составом, что обуславливает несинхронное отрождение дочерних спороцист.

С другой стороны, на показатели численности партенит влияет присутствие окончательных хозяев в исследуемом биотопе. То есть осенний пик численности партенит привязан к моменту скопления птиц на водоеме перед осенней миграцией (рис. 2). Возможно, этот фактор оказывает влияние на численность партенит (Sindermann, Farrin, 1962; Werding, 1969; Pohley, 1976; Mouritsen *et al.*, 1997).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализ зараженности моллюсков – первых промежуточных хозяев трематод

в морских экосистемах прибрежного участка крымского шельфа Черного моря – оказал высокую частоту встречаемости партенит *G. adunca*, что обусловлено как благоприятным температурным режимом внешней среды для развития промежуточных хозяев и развивающихся в них партеногенетических личинок трематод, так и наличием окончательных хозяев, источника инвазионного начала, – яиц трематод.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы рукописи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

Это исследование было проведено в соответствии с этикой и благополучием животных, протокол заседания комиссии по биоэтике ФИЦ ИнБЮМ № 5/23 от 29 декабря 2023 года. Все исследования выполнялись в соответствии с Законом о ветеринарной и медицинской деятельности и Национальным законом о защите животных.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУН ФИЦ ИнБЮМ им. А.О. Ковалевского РАН № 124022400148-4 «Биоразнообразие как основа устойчивого функционирования морских экосистем, критерии и научные принципы его сохранения».

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белоусова Ю.В., Макаров М.В., Лях А.М. Влияние температуры воды на зараженность черноморских моллюсков *Hydrobia acuta* (Draparnaud, 1805) партенитами трематод *Cryptocotyle lingua* // Биология внутренних вод. 2024 (в печати)
- Быховская-Павловская И.Е. Паразитологическое исследование рыб. Ленинград: Наука, 1969. 108 с.
- Дмитриева Е.В., Белофастова И.П., Корнийчук Ю.М., Мачкевский В.К., Пронькина Н.В., Полякова Т.А. Гельминтофауна рыб Карадагского природного заповедника // Сборник научных трудов, посвящ. биологической станции и 30-летию Карадагского природного заповедника НАНУ. Севастополь, 2009. 150 с.
- Макаров М.В. Современное состояние малакофауны рыхлых грунтов в вершинной части бухты Казачьей (Черное море) // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон моря. 2020. № 1. С. 119–130.
- Миронов О.Г., Кирюхина Л.Н., Алемов С.В. Экологическая характеристика бухты Казачья (Черное море) // Экология моря. 2002. Вып. 61. С. 85–89.
- Котельянец Е.А., Гуров К.И., Тихонова Е.А., Соловьева О.В. Некоторые геохимические показатели донных отложений прибрежной акватории под влиянием антропогенного фактора (на примере бухты Казачья, г. Севастополь) // Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науки о земле. 2017. Т. 27. № 1. С. 5–13.
- Пронькина Н.В., Полякова Т.А. Гельминтофауна рыб акватории прибрежно-аквального комплекса заказника «Бухта Казачья» // Материалы VII Международной научно-практической конференции. Симферополь. 2013. С. 365–370
- Чухчин В.Д. Жизненный цикл и рост *Hydrobia acuta* (Drap) и *Hydrobia ventrosa* (Mont) в Черном море // Биология моря. 1976. Вып. 37. С. 85–90.
- Чухчин В.Д. Экология брюхоногих моллюсков Черного моря. Киев: Наукова думка, 1984. 176 с.
- Belousova Yu.V. The First Data on Larvae of Trematodes from the Gastropod *Hydrobia acuta* in the Black Sea // Biol. Bull. Russ. Acad. Sci. 2022. V. 49. №. 1. P. 21–28. <https://doi.org/10.1134/S1062359022020042>
- Britton R.H. Life cycle and production of *Hydrobia acuta* Drap. (Gastropoda: Prosobranchia) in a hypersaline coastal lagoon // Hydrobiologia. 1985. V. 122. P. 219–230. <https://doi.org/10.1007/BF00018282>
- Kube S., Kube J., Bick A. Component community of larval trematodes in the mudsnail *Hydrobia ventrosa*: temporal variations in prevalence in relation to host life history // J. Parasitol. 2002. V. 88. № 4. P. 730–737. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0730:CCOLTI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0730:CCOLTI]2.0.CO;2)
- Mouritsen K.N., Jensen T., Jensen K.T. Parasites on an intertidal Corophium-bed: Factors determining the phenology of microphallid trematodes in the intermediate host populations of the mud snail *Hydrobia ulvae* and the amphipod *Corophium volutator* // Hydrobiologia. 1997. V. 355. P. 61–70. <https://doi.org/10.1023/A:1003067104516>
- Pohley W.J. Relationships among three species of Littorina and their larval digenea. Mar. Biol. 1976. V. 37. P. 179–186. <https://doi.org/10.1007/BF00389127>
- Sindermann C.J., Farrin A.E. Ecological studies of *Cryptocotyle lingua* (Trematoda: Heterophyidae) whose larvae cause “pigment spots” of marine fish // Ecol Soc Am. 1962. V. 43. P. 69–75. <https://doi.org/10.2307/1932041>
- Werding B. Morphologie, Entwicklung und Ökologie digener Trematoden-Larven der Strandschnecke *Littorina littorea*. Mar. Biol. 1969. V. 3. P. 306–333. <https://doi.org/10.1007/BF00698861>

**Effect of water temperature on the size-age structure  
of the population of *Hydrobia acuta* Black Sea molluscs  
and on invasion with *Gynaecotyla adunca* parthenitae**

**Y. V. Belousova<sup>#</sup>, M. V. Makarov, A. M. Lyakh**

*Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation*

*<sup>#</sup>e-mail: julls.belousova@gmail.com*

In the present work, the influence of water temperature on the size-age structure and size of the population of *Hydrobia acuta* molluscs and their invasion with parthenites of the microphallid trematode *Gynaecotyla adunca* in Kazachya Bay (Black Sea) was studied. A positive correlation between the indicators of invasion extensity and the size, abundance of molluscs and water temperature was revealed. It was found that the seasonal dynamics of *G. adunca* parthenites abundance clearly distinguishes the periods of mass infestation of molluscs, which are graphically displayed by two peaks – in July and November. It was confirmed that the life cycle of the Black Sea molluscs *Hydrobia acuta* proceeds similarly to that of Mediterranean individuals

*Keywords:* molluscs, *Hydrobia acuta*, trematoda, parthenitae, *Gynaecotyla adunca*, water temperature

УДК 57.024; 57.026; 599.742.13

## РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА ОЦЕНКИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК СОБАКИ ДОМАШНЕЙ (*CANIS LUPUS FAMILIARIS*) ПУТЕМ ОНЛАЙН-ОПРОСА ВЛАДЕЛЬЦЕВ

© 2024 г. Ю. В. Ганицкая\*, @, А. А. Эвер\*, В. В. Гриценко\*\*,  
Н. Ю. Феоктистова\*, А. В. Суров\*

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

\*\*Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии –

МВА имени К.И. Скрябина, ул. Академика Скрябина, 23, Москва, 109472 Россия

@E-mail: ganickaya@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.06.2024 г.

После доработки 01.07.2024 г.

Принята к публикации 01.07.2024 г.

Оценка индивидуальных поведенческих характеристик (ИПХ) домашних собак представляет для исследователей как фундаментальный, так и практический интерес. В работе представлены результаты разработки и оценки надежности методики оценки ИПХ на основе онлайн-опроса владельцев, не обладающих специальной подготовкой. В опросе приняли участие 4530 респондентов. Опросник включал 20 вопросов, которые оценивались по шкале Ликерта. Методом факторного анализа выявлено 6 факторов, по которым проведено сравнение ИПХ различных породных групп по классификации FCI, а также оценена прогностическая роль породы при определении различий ИПХ собак. Сравнение данных нашего опросника с аналогичными, полученными в США и Японии (Q-BARK), показало, что выделенные факторы в целом совпали (Альфа Кронбаха составила 0.73, что говорит о достаточной надежности методики), хотя вопросы для российской аудитории были сформулированы иначе. Таким образом, данный опросник может быть использован для оценки ИПХ, формирования современного поведенческого портрета конкретной породы, ее соответствия имеющимся стандартам, а также изменений, происходящих в результате отсутствия отбора, например, по рабочим качествам.

**Ключевые слова:** индивидуальность, поведенческие характеристики, собака домашняя, метод онлайн-опроса

**DOI:** 10.31857/S1026347024060099, **EDN:** uknicr

Среди разнообразных проблем, решаемых этологией, особый интерес представляет изучение индивидуальных поведенческих характеристик (ИПХ) (Aria *et al.*, 2021). Под индивидуальностью (“personality”) мы понимаем особенности поведенческих и эмоциональных характеристик конкретной особи. История изучения индивидуальности началась с человека, и основные инструменты оценки личности разрабатывались и отрабатывались психологами. Однако в последние годы вырос интерес к исследованию ИПХ разных видов животных (Gosling, John, 1999). Одним из таких объектов стала домашняя собака (*Canis lupus familiaris*), постоянный спутник человека (Mirkó, Kubinyi *et al.*, 2012; Fratkin, Sinn *et al.*, 2013; Rayment *et al.*, 2015). За последние 20 лет количество научных статей, посвященных

ИПХ собак, возросло в 10 раз (Aria *et al.*, 2021). Одной из главных причин интереса к изучению ИПХ собак является практическая значимость таких исследований. В частности, такие знания могут быть использованы для: 1) оценки совместности владельцев и собак, содержащихся в приютах (Van der Borg *et al.*, 1991; Dowling-Guyer *et al.*, 2011; Valsecchi *et al.*, 2011); 2) выбора перспективных щенков для определенных видов обучения (Goddard, Beilharz, 1982, 1986; Wilsson, Sundgren, 1998; Slabbert, Odendaal, 1999; Serpell, Hsu, 2001; Svobodová *et al.*, 2008; Duffy, Serpell, 2012); 3) выявления поведенческих проблем у собак, проживающих в семьях (Godbout *et al.*, 2007; Godbout, Frank, 2011; Kosztlányi *et al.*), и др.

Для оценки ИПХ применяют различные методы, например поведенческого тестирования

(Wilsson, Sundgren, 1997; Svartberg, 2002; De Meester *et al.*, 2008), при котором собакам предъявляется набор стимулов или создается ситуация, максимально стандартизированная для проведения дальнейших сравнений. Обычно это сложный и трудоемкий процесс, требующий достаточно высокой квалификации. Детальный анализ поведения обычно включает измерение частоты, продолжительности и латентности запуска определенных типов поведения, например таких, как оскал зубов, вздыбленная шерсть и рычание, испуг, проявление любопытства (Netto, Planta, 1997; Van den Berg *et al.*, 2003). Кодирование форм поведения обычно выполняется по заранее оговоренной шкале (Diederich, Giffroy, 2006), которая может фиксировать наличие или отсутствие конкретной формы поведения (демонстрация признаков стресса, таких как облизывание губ, зевота и т.п. или интенсивность их проявления). Например, агрессию оценивают по шкале от 1 до 5, добавление каждого следующего балла будет связано с повышением интенсивности проявления агрессии – рычания, оскала зубов и т. д. (Netto, Planta, 1997). Кроме того, для программирования и кодирования типов поведения требуется не меньше времени, чем для самого тестирования. Тестирование обычно проводят в местах совместного содержания собак, таких как питомники или приюты. Как правило, они представляют собой небольшие выборки, где животные находятся в условиях, отличных от домашних. Кроме того, индивидуальные характеристики собаки формируются в процессе взаимодействия с человеком. Характер этого взаимодействия рабочей, бездомной или семейной собаки значительно различается. Стоит также отметить, что наблюдения за животным в специально созданных условиях (например, при выполнении команд) и в повседневной жизни могут нести принципиально разную информацию об индивидуальности одной и той же особи.

В связи с этим возникает необходимость разработки более современных и менее затратных по времени методов оценки ИПХ собак. В последнее время за рубежом появляется все больше публикаций, посвященных методам оценки ИПХ собак, которые основаны на опросе лиц без специальной кинологической подготовки, но постоянно контактирующих с собаками, и со значительным опытом взаимодействия с ними (например, владельцы собак и члены их семей, ветеринарные врачи и т. д.). Так, эмоциональные особенности собак исследуют с помощью “Опросника эмоциональной реактивности” (Dog Emotional Reactivity Survey) (Szantho *et al.*, 2017). Таким же способом выявляют черты темперамента собак (Goodloe, Borchelt, 1998), оценивают привязанность между хозяином и собакой (Johnson *et al.*, 1992; Zasloff, 1996; Powell *et al.*, 2021). Используются опросники восприятия интеллекта и когнитивных способностей собак – PoDIaCS

(Dog Intelligence and Cognitive Skills Survey) (Howell *et al.*, 2013), описания и оценки поведения собак – C-BARQ (Canine Behavioral Assessment and Research Questionnaire) (Konok *et al.*, 2015).

По сравнению с методом прямого наблюдения опрос позволяет в короткие сроки собрать и обработать большой массив данных. При этом показано, что результаты прямого тестирования практически не отличаются от результатов, полученных методом опроса владельцев (Kubinyi, 2019). Очевидно, что такие работы перспективны и их спектр может и должен быть существенно расширен. В частности, с помощью опроса можно оценить, насколько порода определяет поведенческие различия собак. Исследования этого аспекта пока дают весьма противоречивые результаты. В одних работах показано, что ИПХ собаки определяются породой (Turcsan *et al.*, 2011; Serpell *et al.*, 2014; Eken *et al.*, 2015; Tonoike *et al.*, 2015). Другие свидетельствуют об обратном, порода не определяет поведенческих особенностей собак, с ней связана лишь вероятность проявления определенных черт характера (Morril *et al.*, 2022). В то же время русскоязычные публикации на данную тему практически отсутствуют. По результатам опросов, проведенных исследователями в Москве и Санкт-Петербурге, оценивали в первую очередь отношение владельца к животному, а не поведенческие особенности последних (Никольская, 2019). Кроме того, из-за культурных различий и особенностей менталитета в разных странах необходимо валидировать опросники конкретно для каждой страны. Например, при использовании одного и того же опросника C-BARQ 22 из 100 вопросов были исключены из-за культурных различий между Японией и США, в результате чего для японской версии осталось 78 вопросов (Tonoike *et al.*, 2016). Таким образом, с целью получения объективной оценки ИПХ домашних собак в России необходимо использовать опросники, адаптированные к условиям страны, менталитету владельцев и особенностям поголовья собак.

Целями настоящего исследования стали разработка опросника ИПХ собак, адаптированного для РФ, получение с его помощью первичных результатов и оценка валидности метода при сравнении с существующими зарубежными аналогами. Важной составляющей такой работы явилось получение данных о связи породных и индивидуальных черт собак.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего в опросник был включен 41 вопрос, из них 20 относились к оценке ИПХ собаки.

Вопросы по ИПХ разделены на 5 смысловых групп:

1. Агрессивность собаки (пример: “Агрессивность по отношению к другим собакам”). В блок включены все формулировки, касающиеся возмозжных объектов агрессии (5 вопросов).

2. Активность собаки (пример: “Общая активность”). Здесь мы ориентировались на интуитивно понятные характеристики, связанные с уровнем активности (6 вопросов).

3. Социальные характеристики собаки (пример: “Общительность”). К данной категории были отнесены вопросы, касающиеся социальных взаимодействий собаки (3 вопроса).

4. Восприимчивость собаки к дрессировке (пример: “Дрессируемость/способность к научению”). В данный блок вошли все вопросы, связанные с дрессировкой (4 вопроса).

5. Сторожевые качества собаки (пример: “Способность к охране территории”). В данный блок были включены утверждения, связанные с охраной территории и владельца (3 вопроса).

Онлайн-опрос был проведен в феврале 2021 года на платформе “Google” (<https://www.google.ru/forms/>) с использованием социальных сетей. Способом выражения субъективной оценки было шкалирование, где пункты шкалы описаны также в терминах обыденной речи, например “отсутствует” или “выражен значительно” для характеристики признака.

В исследовании приняли участие 4971 владельцев собак, из них полностью заполнили опросник 4530 человек. Было получено описание поведенческих характеристик 4530 собак, среди них 2332 кобеля, 2198 сук, которые были объединены в 10 породных групп по классификации FCI (<http://www.fci.be/en/Nomenclature/>), и отдельно была выделена группа беспородных и метисов (одиннадцатая группа) (табл. 1).

Рекрутинг респондентов осуществлялся методом “снежного кома” среди владельцев собак, социально активных в сетевом пространстве, для которых тема взаимодействия с собакой являлась одним из поводов

для коммуникации в сети. Информация об опросе распространялась через социальные сети и путем публикации на сайтах дрессировочных центров. Участие в опросе было добровольным и не предполагало вознаграждения за заполнение опросника.

Данные заполненных анкет были подвергнуты эксплораторному факторному анализу – статистическому методу сжатия информации путем группировки элементов опроса (в данном случае) по связанным факторам или подшкалам с помощью программы Python (версия Python 3.10.12). Правило собственных значений Кайзера использовалось для определения количества интерпретируемых факторов, которые можно было извлечь, в графике (“каменистая осыпь”) рассматривались только факторы, собственные значения которых больше 1 (рис. 1).

Вращение Варимакс использовалось для определения эмпирических группировок элементов, которые измеряли различные поведенческие черты (Williams *et al.*, 2010). Пункты были отнесены к факторам, на которые они имели самые высокие нагрузки (табл. 2).

Коэффициент Кронбаха  $\alpha$  рассчитывался для оценки внутренней согласованности извлеченных факторов (внутренней надежности). Этот коэффициент показывает, насколько хорошо группа пунктов анкеты фокусируется на одной идее или конструкции. Достоверными считались факторы со значениями  $\alpha$  Кронбаха  $\geq 0.70$ .

Для выявления статистически значимой разницы между медианами независимых групп проводили сравнение ИПХ породных групп, используя критерий Краскела–Уоллиса. Если статистическая достоверность была доказана, проводили тест Данна для выяснения, какие именно группы различаются на статистически значимом уровне. Для того чтобы оценить, насколько порода определяет индивидуальные черты, сравнивали внутригрупповые и межгрупповые дистанции в соответствующем пространстве признаков.

**Таблица 1.** Количество представителей в породных группах

Код группы	Породная группа	Количество
1	Пастушьи и скотогонные собаки	713
2	Пинчеры и шнауцеры, молоссы, горные и швейцарские скотогонные собаки	967
3	Терьеры	692
4	Таксы	113
5	Шпицы и примитивные породы	421
6	Гончие и родственные породы	230
7	Легавые	201
8	Ретриверы, спаниели и водяные собаки	276
9	Декоративные и собаки-компаньоны	514
10	Борзые	106
11	Беспородные и метисы	120

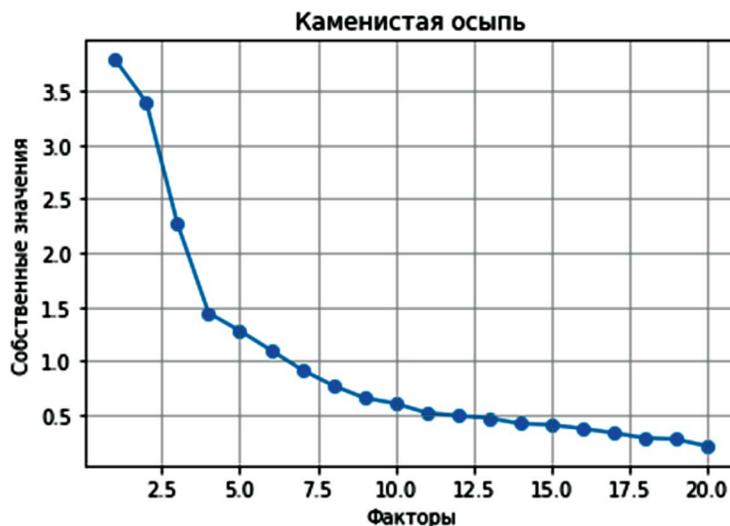


Рис. 1. График каменистой осыпи.

Таблица 2. Нагрузки при вращении Варимакс

ИПХ/Факторы	1	2	3	4	5	6
Агрессия к собакам	0.42297	0.127198	0.149898	-0.07574	0.168167	-0.12405
Агрессия к чужим	0.702272	0.025034	0.206097	-0.01708	0.047498	-0.07284
Агрессия к хозяину	0.072153	0.05543	0.745841	-0.03819	0.120184	-0.07525
Агрессия к членам семьи	0.138926	0.010081	0.913882	-0.0426	0.088916	-0.04625
Сторожевой лай	0.810107	0.056283	-0.00061	0.037998	-0.0063	0.038354
Качества защитника	0.802695	0.021513	-0.00788	0.220748	0.065707	0.028952
Способность к охране территории	0.843294	0.001539	-0.05225	0.164215	0.05386	-0.00389
Обучаемость	0.066371	0.19385	-0.04775	0.68599	-0.28024	0.021595
Упрямство	0.105734	0.081756	0.118841	-0.16285	0.666847	-0.02533
Возбудимость	0.144933	0.573797	0.118468	-0.11736	0.059438	0.012196
Общая активность	0.064143	0.81359	-0.02095	0.145061	0.007906	0.089474
Склонность к лаю	0.373892	0.254049	0.075608	-0.12983	-0.01351	0.065486
Потребность в прогулках	0.112074	0.59344	-0.00624	0.196827	0.1054	-0.01574
Привязанность к хозяину	0.214724	-0.01671	-0.07525	0.271	-0.21141	0.464821
Послушность	0.031509	-0.04311	-0.08716	0.573601	-0.48677	0.187193
Общительность	-0.23023	0.305015	-0.05885	0.160874	-0.04063	0.451694
Независимость	0.104162	-0.0021	0.072262	0.021837	0.673462	-0.23483
Сообразительность	0.073491	0.16158	-0.00769	0.610813	0.102923	0.170828
Игривость	-0.06637	0.643924	-0.01836	0.208041	-0.09845	0.329421
Потребность в ласке	-0.02759	0.107606	-0.04498	0.031883	-0.13217	0.690546

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мера адекватности выборки Кайзера–Майера–Олкина составила 0.78, критерий Бартлетта –  $p < 0.0001$ , т.е. данные отвечают всем требованиям для проведения факторного анализа. В результате обработки данных было выделено шесть факторов.

Чтобы определить состав этих факторов, провели саму процедуру факторного анализа.

К одному фактору были отнесены переменные с наиболее высокими нагрузками. Переменную относили к тому фактору, с которым ее корреляция была максимальной, то есть выбирали фактор с максимальной факторной нагрузкой для этой

переменной. Таким образом, было получено распределение по шести факторам (табл. 3). Основные результаты опроса представлены на рисунках 2–5.

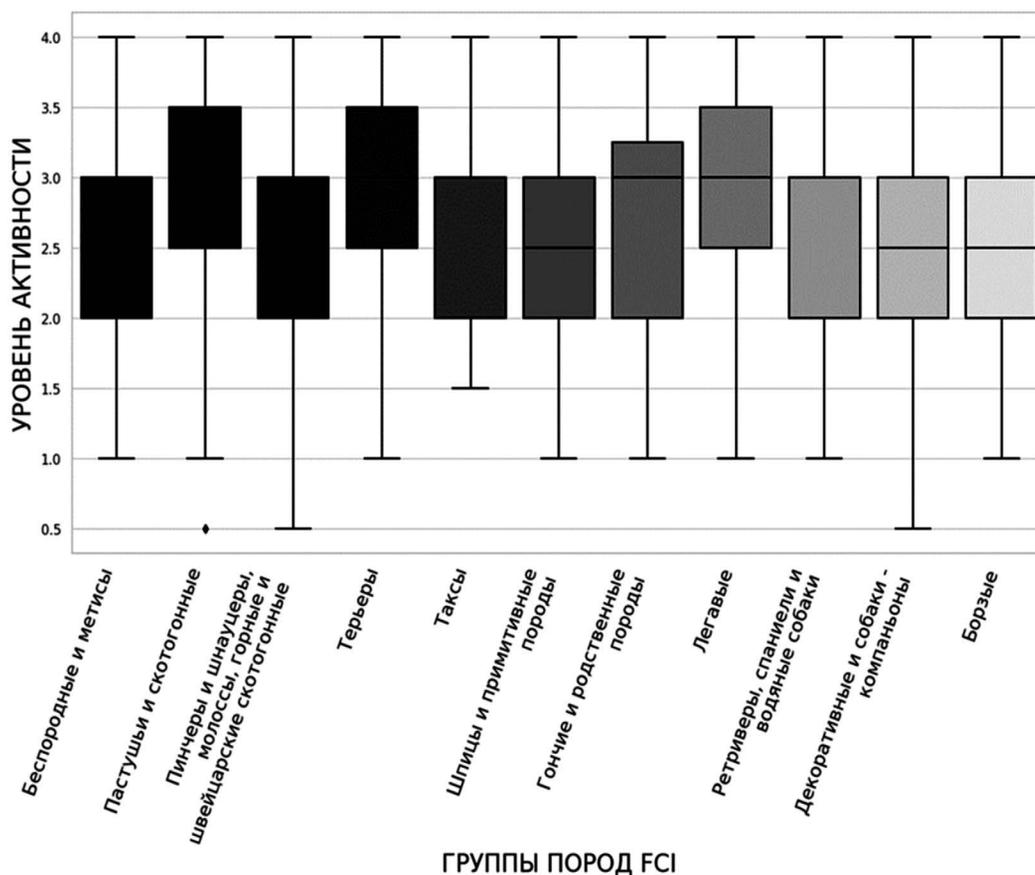
Все породные группы, кроме примитивных пород и шпицев, показали высокую потребность в общении с человеком. Уровень активности собак существенно различается по породным группам. Высокая активность характерна для пастушьих и скотогонных собак, терьеров и легавых. Много активных собак встречается также среди гончих, но эта породная группа разнообразна по уровню активности (рис. 2). Примерно одинаковый уровень

активности демонстрируют ретриверы, спаниели и водяные собаки, декоративные и собаки-компаньоны, а также борзые.

По уровню агрессии и сторожевым качествам высокие показатели имеют метисы, пастушьи и скотогонные, пинчеры, шнауцеры и швейцарские скотогонные собаки, а также таксы (рис. 3). Средний уровень агрессии показывают шпицы и примитивные породы, терьеры, легавые и декоративные. Низкая агрессивность характерна для ретриверов, спаниелей и водяных собак, а также борзых.

**Таблица 3.** Распределение переменных по шести факторам

Индивидуальные поведенческие характеристики	Факторы
Агрессия к собакам, агрессия к чужим, сторожевой лай, качества защитника, способность к охране территории, склонность к лаю	1
Возбудимость, общая активность, потребность в прогулках, игривость	2
Агрессия к хозяину, агрессия к членам семьи	3
Обучаемость, послушность, сообразительность	4
Упрямство, независимость	5
Привязанность к хозяину, общительность, потребность в ласке	6



**Рис. 2.** Уровень активности по группам пород.

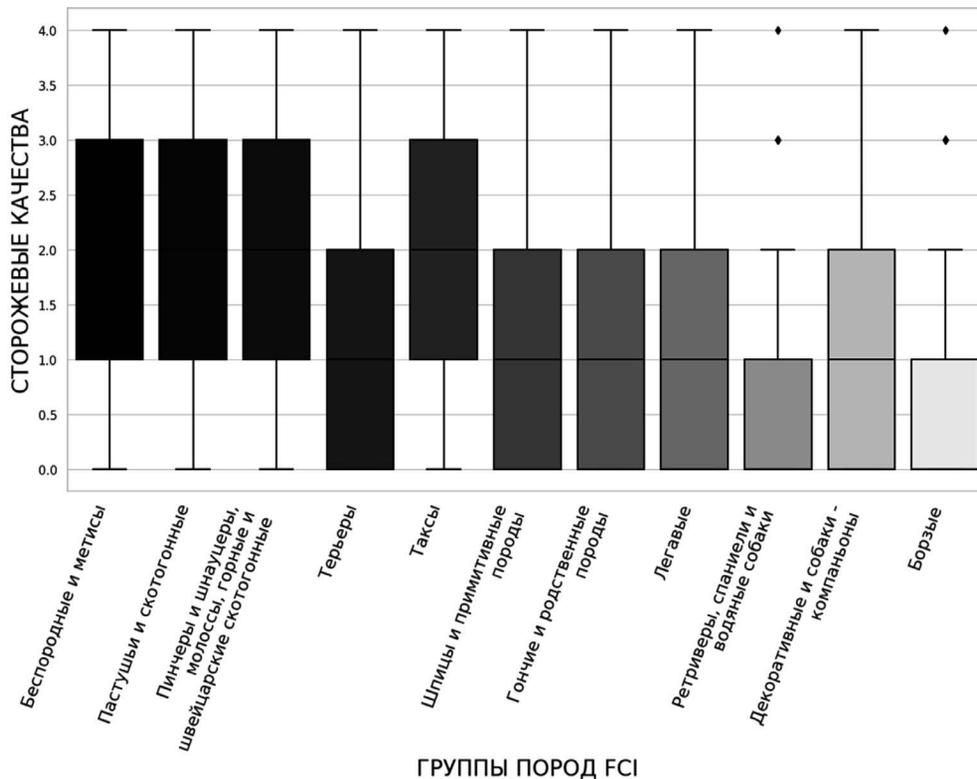


Рис. 3. Сторожевые качества по группам пород.

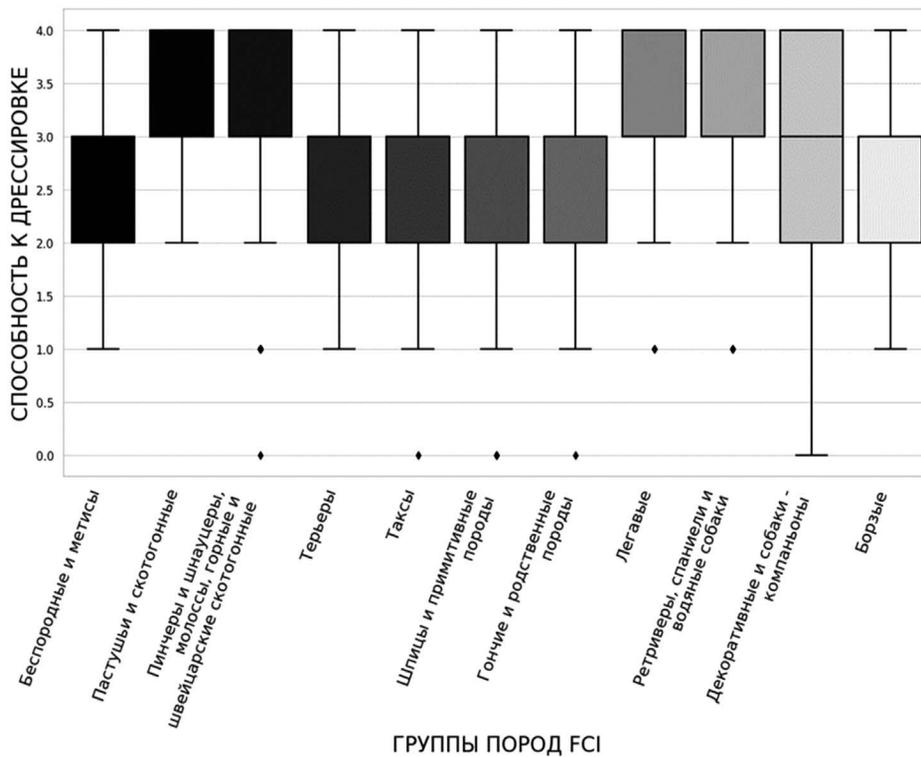


Рис. 4. Способность к дрессировке по группам пород.

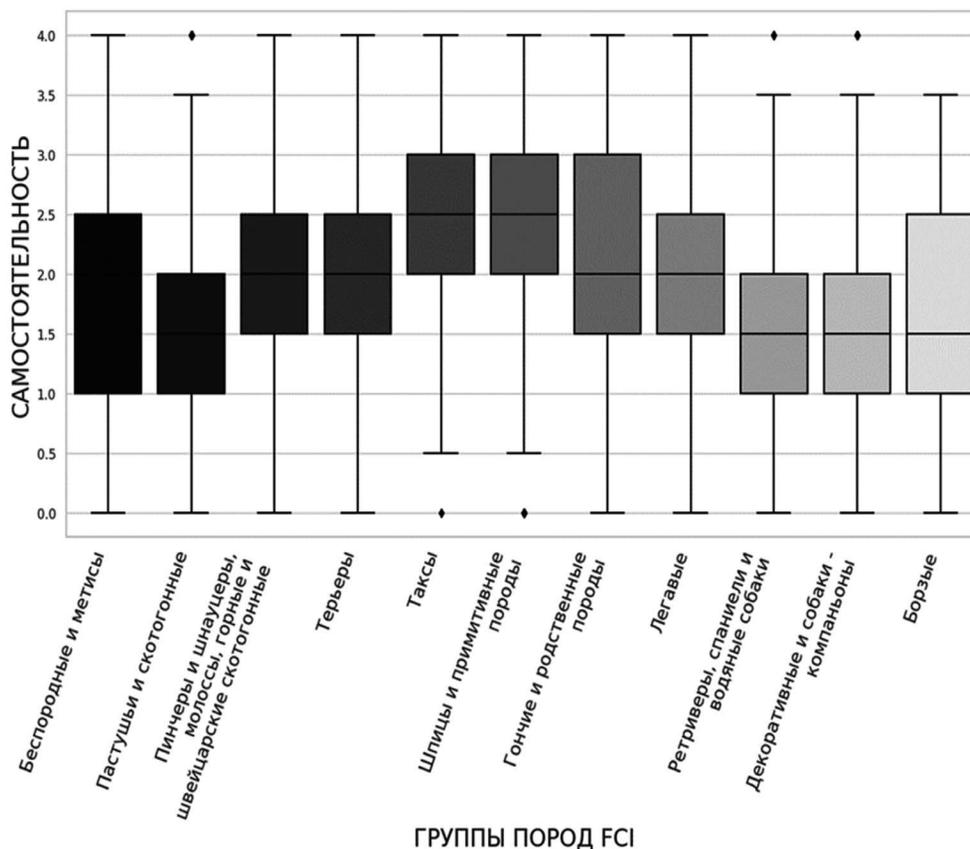


Рис. 5. Самостоятельность по группам пород.

По способности к дрессировке (“обучаемость”) самые высокие результаты показали группы пастушьих и скотогонных, пинчеров, шнауцеров и швейцарских скотогонных, а также легавых и ретриверов (рис. 4). У остальных групп уровень ниже, а декоративные и компаньоны имеют большой разброс по этим качествам.

По фактору “Самостоятельность” выявлен большой разброс в группах. (рис. 5). Самые высокие показатели у аборигенных и примитивных пород, а также у такс. Самые низкие – у пастушьих и скотогонных, ретриверов, декоративных пород и собак-компаньонов. Средние – у пинчеров и т.д., терьеров гончих и легавых. Большое разнообразие в группе по этому фактору показали метисы и борзые.

Агрессия к хозяевам выделилась как фактор, но сила корреляции между вопросами внутри шкалы значительно превышает силу корреляций с вопросами прочих шкал (иными словами, мы можем выделить агрессию к хозяевам в отдельный фактор, но не можем предсказать ее значения на основе значений других шкал).

В ходе анализа связи ИПХ собаки с породой было показано, что большинство породных групп

ИПХ соответствуют особенностям породы в целом, но проявляются по-разному. При этом для ряда породных групп такое утверждение неверно, так как внутригрупповая дистанция у них меньше, чем межгрупповая (рис. 6).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сравнение данных нашего опросника с аналогичными, полученными в США и Японии (Q-BARK) показало, что выделенные нами факторы во многом совпали, хотя сами вопросы для российской аудитории были сформулированы более лаконично. Следующие характеристики: общая активность, сторожевые качества (в которые вошли разные виды агрессии и охрана территории), способность к дрессировке (обучаемость), потребность в общении с человеком (контактность) совпадают с данными американских и японских исследователей, несмотря на то что породы в американской классификации AKC сгруппированы несколько иначе, чем в классификации FCI, которая была использована нами.

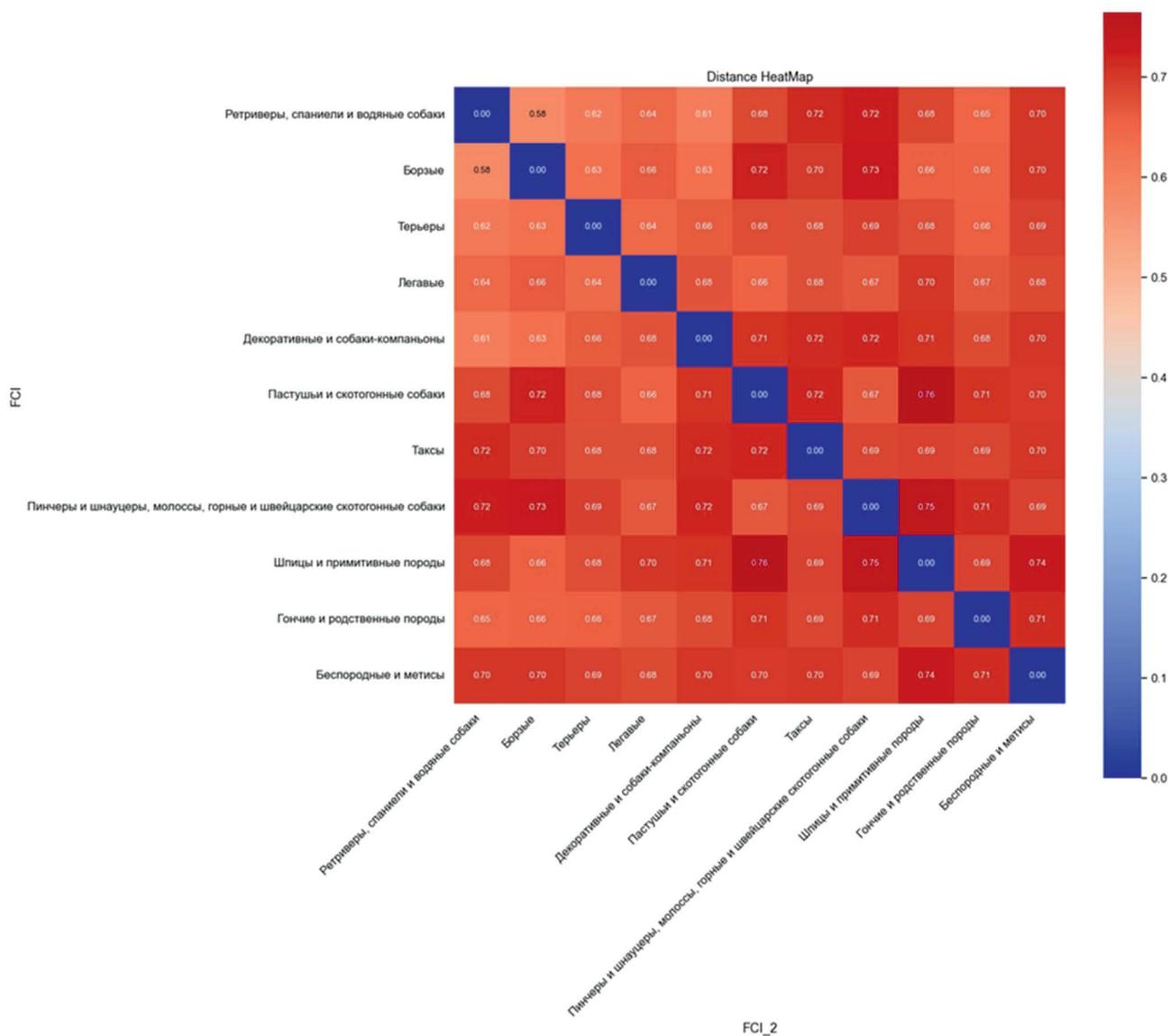


Рис. 6. Тепловая карта дистанций между породными группами.

Кроме 10 породных групп в наш опросник были включены беспородные собаки и метисы, так как количество последних, взятых из приютов и с улицы, в России очень велико. Соответственно, оценка поведения таких собак представляет особый интерес для исследователей.

Основные различия между породными группами были также очень сходными. Так, например, если рассматривать потребность в общении с человеком, то самые низкие показатели выявлены у собак примитивных пород и шпицев. Это может быть связано с влиянием прямого отбора на поведенческие характеристики или с различиями в условиях жизни, в которых формировались породы. Существенными причинами различий

в ИПХ мы считаем меньшее влияние на них человеческого фактора, то есть примитивные породы и шпицы формировались стихийно, без участия целенаправленного отбора. Низкий уровень привязанности и поиска внимания у древних пород и шпицев отмечен также японскими исследователями (Tonoike *et al.*, 2015). Данный факт подтверждает также то, что примитивные породы, по нашим данным, имеют самые высокие показатели самостоятельности из всех групп. Исключение составляют таксы, у которых эти показатели еще выше, что вполне объяснимо исходя из их охотничьей специализации, направленной на самостоятельную работу по зверю в норе. Гончие собаки также имеют высокие показатели

самостоятельности, это связано с работой по следу независимо от человека и, зачастую, на большом расстоянии от хозяина.

Низкие показатели самостоятельности, напротив, имеют пастушьи и скотогонные собаки, спаниели, ретриверы и группа декоративных собак, что может быть связано для первых двух групп с тесным взаимодействием с человеком при служебном использовании, а для мелких декоративных собак — с отбором по качествам собаки-компаньона, близкой к человеку. Средние показатели самостоятельности имеют собаки беспородные и метисы, терьеры, гончие и родственные породы, а также легавые. Это можно объяснить направленным отбором у охотничьих собак в сторону баланса между самостоятельностью и управлением человеком на охоте. У беспородных собак и метисов средние показатели самостоятельности могут быть обусловлены большим разнообразием вариантов поведения.

По способности к дрессировке в нашем опросе, так же как и в анкете C-BARQ, были выявлены достоверные породные различия. Охотничьи и рабочие породы собак (английские спрингер-спаниели, золотистые ретриверы, лабрадоры-ретриверы, пуделя, ротвейлеры и шотландские овчарки) обучались лучше, чем гончие (бассет-хаунд и такса), терьеры (вест-хайленд-уайт терьеры и йоркширские терьеры) и сибирский хаски (древние породы) (Serpell, Hsu, 2005), что вполне укладывается в функциональные рамки породы. Сложные задачи, выполняемые в тандеме с людьми-партнерами, требуют внимания и сосредоточенности, отзывчивости на сигналы и указания, подаваемые людьми, и, естественно, влияют на скорость обучения. Напротив, декоративные породы имеют большой разброс по фактору обучаемости, так как они, с одной стороны “не обязаны” работать, а с другой, должны быть близки к человеку как компаньоны.

По сторожевым качествам, в которые входила агрессивность, связанная с охраной территории и владельца, самые высокие показатели отмечены у беспородных, пастушьих и скотогонных собак, пинчеров, шнауцеров, молоссов и горных скотогонных, а также такс. Это можно объяснить целями, ради которых выводились указанные породы, в том числе охрана скота и имущества владельца. Агрессивность такс может быть связана с особенностями использования на охоте, где собака должна самостоятельно задерживать зверя в норе. Средние показатели по этому фактору показали терьеры, примитивные породы и шпицы, легавые, а также декоративные и собаки-компаньоны. Для этих породных групп не характерно использование, связанное с агрессией к человеку или зверю. Ниже средних значений по показателю агрессивности у ретриверов, спаниелей

и борзых, также можно объяснить условиями выведения и применения этих пород человеком.

Интересен вопрос о прогностической ценности породы, т.е. какие черты поведения в большей степени обусловлены породой, а какие определяются ИПХ. Можно предположить, что для находящихся под более жестким отбором черт собак, таких как послушание, знание происхождения породы может сделать поведенческие прогнозы более точными, однако для других черт поведения, отбор по которым был менее строгим, — практически неинформативна. Например, насколько легко собака провоцируется пугающими или некомфортными стимулами. Таким образом, порода, как правило, не полностью предсказывает индивидуальное поведение собаки и должна использоваться для принятия решений, касающихся выбора домашней собаки, с осторожностью. С другой стороны, внутривидовые различия в ИПХ могут быть результатом ограничения постоянного давления искусственного отбора. Это обусловлено тем, что сейчас отбор часто ведется по экстерьерным признакам, без учета качеств, которые служили критериями для выведения породы. Рабочие собаки являются исключением, было показано, что линии рабочих собак демонстрируют большие межпородные поведенческие различия, чем линии домашних или выставочных собак. Порода бордер-колли, например, сильно выделялась из других пород, поскольку она была зарегистрирована в Клубе собаководов только в середине 1970-х годов и не утратила своих рабочих качеств (Fadel *et al.*, 2016).

Итак, наши исследования показали, что предложенный метод опроса работает и позволяет составить достаточно подробное представление об ИПХ породных групп собак в России. В дальнейшем мы предполагаем расширить круг вопросов и включить в число оцениваемых факторов взаимодействие собак и их владельцев.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИПЭЭ РАН FFER-2021-0004.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

У соавторов статьи отсутствует конфликт интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Никольская А. В., Костригин А. А.* Оценка конвергентной и дивергентной валидности теста-опросника владельцев собак, предъявляющих жалобы на неадекватное поведение питомцев, не демонстрирующих отклоняющегося поведения // Экспериментальная психология. 2019. Т. 12. № 2. С. 98–111.  
https://doi.org/10.17759/exppsy.2019120208
- Aria M., Alterisio A., Scandurra A., Pinelli C., D'Aniello B.* The scholar's best friend: Research trends in dog cognitive and behavioral studies // Anim. Cogn. 2021. Т. 24. V. 3. P. 541–553.  
https://doi.org/10.1007/s10071-020-01448-2
- De Meester R., De Bacquer D., Peremans K., Vermeire S., Planta D., Coopman F., Audenaert K.* A preliminary study on the use of the Socially Acceptable Behavior test as a test for shyness/confidence in the temperament of dogs // J. Vet. Behav. 2008. Т. 3. V. 4. P. 161–170.  
https://doi.org/10.1016/j.jveb.2007.10.005
- Diederich C., Giffroy J.* Behavioural testing in dogs: A review of methodology in search for standardization // Appl. Anim. Behav. Sci. 2006. Т. 97. V. 1. P. 51–72.  
https://doi.org/10.1016/j.applanim.2005.11.018
- Dowling-Guyer S., Marder A., D'arpino S.* Behavioral traits detected in shelter dogs by a behavior evaluation // Appl. Anim. Behav. Sci. 2011. V. 130. P. 107–114.  
https://doi.org/10.1016/j.applanim.2010.12.004
- Duffy D., Serpell J.* Predictive validity of a method for evaluating temperament in young guide and service dogs // Appl. Anim. Behav. Sci. 2012. V. 138. P. 99–109.  
https://doi.org/10.1016/j.applanim.2012.02.011
- Eken A. H., Fikse W. F., Nilsson K., and Strandberg E.* Breed differences in everyday behaviour of dogs. Appl. Anim. Behav. Sci. 2015. V. 169. P. 69–77.  
https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.04.010
- Fadel F., Driscoll P., Pilot M.* Differences in Trait Impulsivity Indicate Diversification of Dog Breeds into Working and Show Lines // Sci Rep 6, 221622016.  
https://doi.org/10.1038/srep22162
- Fratkin J., Sinn D., Patall E.A., Gosling S.D.* Personality consistency in dogs: a meta-analysis // PLoS ONE. 2013. V. 8. e54907.  
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054907
- Godbout M., Frank D.* Excessive mouthing in puppies as a predictor of aggressiveness in adult dogs // J. Vet. Behav. 2011. Т. 1. V. 6. P. 93.  
https://doi.org/10.1016/j.jveb.2010.08.021
- Godbout M., Palestini C., Beauchamp G., Frank D.* Puppy behavior at the veterinary clinic: A pilot study // J. Vet. Behav. 2007. Т. 2. V. 4. P. 126–135.  
https://doi.org/10.1016/j.jveb.2007.06.002
- Goddard M., Beilharz R.* Genetic and environmental factors affecting the suitability of dogs as guide dogs for the blind // Theor. Appl. Genet. 1982. V. 62. P. 97–102.  
https://doi.org/10.1007/BF00293339
- Goddard M., Beilharz R.* Early prediction of adult behaviour in potential guide dogs // Appl. Anim. Behav. Sci. 1986. V. 15. P. 247–260.  
https://doi.org/10.1007/BF00293339
- Goodloe L. P., Borchelt P. L.* Companion Dog Temperament Traits // J. Appl. Anim. Welf. Sci. 1998. Т. 1. V. 4. P. 303–338.  
https://doi.org/10.1207/s15327604jaws0104\_1
- Gosling S.D., John O.P.* Personality dimensions in nonhuman animals a cross-species review // Curr. Dir. Psychol. Sci. 1999. V. 8. P. 69–75.  
https://doi.org/10.1207/s15327604jaws0104\_1
- Howell T., Toukhsati S., Conduit R., Bennett P.* The Perceptions of Dog Intelligence and Cognitive Skills (PoDIaCS) Survey // J. Vet. Behav. 2013. Т. 8. V. 6. P. 418–424.  
https://doi.org/10.1016/j.jveb.2013.05.005
- Johnson T., Garrity F., Stallones L.* Psychometric Evaluation of the Lexington Attachment to Pets Scale (Laps) // Anthrozoös. 1992. Т. 5. V. 3. P. 160–175.  
https://doi.org/10.2752/089279392787011395
- Konok V., Kosztolányi A., Rainer W., Mutschler B., Halsband U., & Miklósi Á.* Influence of owners' attachment style and personality on their dogs (*Canis familiaris*) separation-related disorder // PLoS one. 2015. Т. 10. № 2. С. e0118375.  
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118375
- Kosztolányi A., Rainer W., Mutschler B., Halsband U., Miklósi Á.* Influence of Owners' Attachment Style and Personality on Their Dogs' (*Canis familiaris*) Separation-Related Disorder. PLoS One. 2015. V. 10. P. e0118375.  
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118375
- Kubinyi E., Wallis J.* Dominance in dogs as rated by owners corresponds to ethologically valid markers of dominance // PeerJ. 2019. Т. 7. P. e6838.  
https://doi.org/10.7717/peerj.6838
- Mirkó E., Kubinyi E., Gácsi M., Miklósi Á.* Preliminary analysis of an adjective-based dog personality questionnaire developed to measure some aspects of personality in the domestic dog (*Canis familiaris*) // Appl. Anim. Behav. Sci. 2012. V. 138. P. 88–98.  
https://doi.org/10.1016/j.applanim.2012.02.016
- Morrill K., Hekman J., Li X., McClure J., Logan B., Goodman L., Gao M., Dong Y., Alonso M., Carmichael E., Snyder-Mackler N.* Ancestry-inclusive dog genomics challenges popular breed stereotypes // Science. 2022. Т. 376. V. 6592. P. eabk0639.  
https://doi.org/10.1126/science.abk0639
- Netto W., Planta D.* Behavioural testing for aggression in the domestic dog // Appl. Anim. Behav. Sci. 1997. Т. 52. V. 3–4. P. 243–263.  
https://doi.org/10.1016/S0168-1591(96)01126-4
- Powell L., Stefanovski D., Siracusa C., Serpell J.* Owner personality, owner-dog attachment, and canine demographics influence treatment outcomes in canine behavioral medicine cases // Front. vet. sci. 2021. Т. 7. P. 630931.  
https://doi.org/10.3389/fvets.2020.630931

- Rayment D., De Groef B., Peters R., Marston L.* Applied personality assessment in domestic dogs: Limitations and caveats // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2015. V. 163. P. 1–18.  
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2014.11.020>
- Serpell A., Duffy L.* Dog breeds and their behavior. // *Domestic dog cognition and behavior: The scientific study of Canis familiaris.* Springer Berlin Heidelberg, 2014. 31–57 p.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-53994-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-53994-7_2)
- Serpell J.A., Hsu Y.A.* Effects of breed, sex, and neuter status on trainability in dogs // *Anthrozoös.* 2005. T. 18. № 3. C. 196–207.  
<https://doi.org/10.2752/089279305785594135>
- Serpell J., Hsu Y.*, 2001. Development and validation of a novel method for evaluating behavior and temperament in guide dogs // *Appl. Anim. Behav. Sci.* V. 72. P. 347–364.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(00\)00210-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(00)00210-0)
- Slabbert J., Odendaal J.* Early prediction of adult police dog efficiency – a longitudinal study // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1999. V. 64. P. 269–288.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(99\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(99)00038-6)
- Svartberg K.* Shyness–boldness predicts performance in working dogs // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2002. T. 79. V. 2. P. 157–174.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(02\)00120-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(02)00120-X)
- Svobodová I., Vápeník P., Pinc L., Bartoš L.* Testing German shepherd puppies to assess their chances of certification // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2008. V. 113. P. 139–149.  
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.09.010>
- Szantho F., Miklosi A., Kubinyi E.* Is your dog empathic? Developing a Dog Emotional Reactivity Survey // *PLoS One.* 2017. T. 12. V. 2. P. e0170397.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170397>
- Tonoike A., Nagasawa M., Mog K., Serpell A., Ohtsuki H., Kikusui T.* Comparison of owner-reported behavioral characteristics among genetically clustered breeds of dog (*Canis familiaris*) // *Sci. Rep.* 2015. T. 5. V. 1. P. 17710.  
<https://doi.org/10.1038/srep17710>
- Turcsán B., Kubinyi E., Miklósi Á.* Trainability and boldness traits differ between dog breed clusters based on conventional breed categories and genetic relatedness // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2011. T. 132. V. 1–2. P. 61–70.  
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.03.006>
- Valsecchi P., Barnard S., Stefanini C., Normando S.* Temperament test for re-homed dogs validated through direct behavioral observation in shelter and home environment // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2011. V. 6. P. 161–177.  
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.03.006>
- Van den Berg L., Schilder M., Knol B.* Behavior genetics of canine aggression: behavioral phenotyping of golden retrievers by means of an aggression test // *Behav. Genet.* 2003. V. 33. P. 469–483.  
<https://doi.org/10.1023/A:1025714431089>
- Van der Borg M., Netto J., Planta U.* Behavioral-testing of dogs in animal shelters to predict problem behavior // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1991. V. 32. P. 237–251.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(05\)80047-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(05)80047-4)
- Williams B., Onsmann A., Brown T.* Exploratory factor analysis: A five-step guide for novices // *Australis. J. Paramed.* 2010. T. 8. P. 1–13.  
<https://doi.org/10.33151/ajp.8.3.93>
- Wilsson E., Sundgren P.* Behavior test for eight-week old puppies – heritability's of tested behavior traits and its correspondence to later behavior // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1998. V. 58. P. 151–162.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(97\)00093-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(97)00093-2)
- Wilsson E., Sundgren.* The use of a behaviour test for the selection of dogs for service and breeding, I: Method of testing and evaluating test results in the adult dogs, demands on different kinds of service dogs, sex, and breed differences // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1997. T. 53. V. 4. P. 279–295.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(96\)01174-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(96)01174-4)
- Zasloff R.* Measuring attachment to companion animals: a dog is not a cat is not a bird // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1996. V. 47. P. 43–48.  
[https://doi.org/10.1016/0168-1591\(95\)01009-2](https://doi.org/10.1016/0168-1591(95)01009-2)

## Development and validation of a method for assessing individual behavioral characteristics of a domestic dog (*Canis lupus familiaris*) by online survey of owners

**Yu. V. Ganitskaya<sup>1, #</sup>, A. A. Ever<sup>1</sup>, V. V. Gritsenko<sup>2</sup>, N. Yu. Feoktistova<sup>1</sup>, A. V. Surov<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

<sup>2</sup>*Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA by K.I. Skryabin, Moscow, 109472 Russia*

<sup>#</sup>*E-mail: ganickaya@yandex.ru*

Assessment of individual behavioral characteristics (IBC) of domestic dogs is of both fundamental and practical interest to researchers. The paper presents the results of developing and assessing the reliability of a methodology for assessing IPC based on an online survey of owners who do not have special training. 4530 respondents took part in the survey. The questionnaire included 20 questions,

which were rated on a Likert scale. Using the factor analysis method, 6 factors were identified, by which the IPC of different breed groups was compared according to the FCI classification, and the prognostic role of breed in determining differences in the IPC of dogs was assessed. A comparison of the data from our questionnaire with similar ones obtained in the USA and Japan (Q-BARK) showed that the identified factors generally coincided (Cronbach's Alpha was 0.73, which indicates sufficient reliability of the methodology), although the questions for the Russian audience were formulated differently. Thus, this questionnaire can be used to assess the IPC, the formation of a modern behavioral portrait of a particular breed, its compliance with existing standards, as well as changes that occur as a result of the lack of selection, for example, for working qualities.

*Keywords:* personality, behavioral characteristics, domestic dog, online survey method

УДК: 612.017.1 (470.1)

**ВЗАИМОСВЯЗЬ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ sCD56 И sCD16  
С УРОВНЕМ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК, ЦИТОКИНОВ,  
ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ  
И ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ  
У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ,  
ПРОЖИВАЮЩИХ НА АРКТИЧЕСКОЙ ТЕРРИТОРИИ**

© 2024 г. А. В. Самодова\*, @, Л. К. Добродеева\*, В. П. Патракеева\*

\*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаверова Уральского отделения Российской академии наук, пр. Никольский, 20, г. Архангельск, 163020 Россия

@E-mail: annapoletaeva2008@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.01.2024 г.

После доработки 15.05.2024 г.

Принята к публикации 15.05.2024 г.

Изучали содержание иммунокомпетентных клеток крови, фагоцитарную активность нейтрофилов, концентрации цитокинов, циркулирующих иммунных комплексов и уровни циклических нуклеотидов (цАМФ и цГМФ) сыворотки крови с разным уровнем растворимых молекул адгезии NCAM (CD56) и иммуноглобулина Fc-рецептора III (CD16) у практически здоровых людей, проживающих на Арктической территории. Установлено, что увеличение концентрации в сыворотке крови sCD56 и sCD16 у практически здоровых взрослых лиц трудоспособного возраста ассоциировано с повышением содержания клеток с соответствующими мембранными рецепторами. Увеличение концентрации sCD56 происходит с повышением содержания НК-клеток (CD3-CD16+CD56+) и Т-НК клеток (CD3+CD16+CD56+). Увеличение уровня sCD16 сопровождается снижением содержания циркулирующих в крови лимфоцитов преимущественно Т-хелперов (CD3+CD4+), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+) и активированных Т-лимфоцитов (CD3+HLA DR+). Повышение концентраций sCD56 ассоциировано с увеличением содержания провоспалительных IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  и противовоспалительного IL-10. Концентрации циркулирующих иммунных комплексов повышаются с увеличением содержания sCD16 и sCD56. Повышение активности проведения сигнала с увеличением содержания лейкоцитов периферической крови CD16+ и CD56+ и шеддинга данных молекул происходит на фоне снижения концентраций цАМФ и цГМФ.

*Ключевые слова:* sCD56, sCD16, цитокины, циркулирующие иммунные комплексы, цАМФ, цГМФ  
**DOI:** 10.31857/S1026347024060107, **EDN:** ukjzou

Кластер дифференциации CD56 обнаружен на клетках нейрогенного происхождения, мышечных клетках, натуральных киллерах, в том числе тимического происхождения, а также на различных популяциях Т-лимфоцитов, нейтрофилах, моноцитах, эпителиальных и дендритных клетках (Kussick, Wood, 2003; Gong *et al.*, 2013). Появление CD56 на поверхности клетки является одним из признаков ее зрелости (Abel *et al.*, 2018; Euchner *et al.*, 2021). CD56 опосредует проведение сигналов, направленных на усиление продукции и секреции хемокинов, интегринов, ферментов, цитокинов и других биологически активных веществ, характерных для данного типа клеток (Crinier *et al.*, 2020). В крови циркулируют мононуклеары

CD56<sup>dim</sup> и CD56<sup>bright</sup> с преобладанием секреции литических гранул перфоринов, гранзимов и цитокинов (Li *et al.*, 2020; Watanabe *et al.*, 2021). По сведениям, представленным в публикациях 2014–2016 гг., эти две популяции не только различаются фенотипически и функционально, но также по-разному представлены в системном кровообращении и тканях. CD56<sup>dim</sup>-популяция составляет подавляющее большинство (80%–95%) НК-клеток периферической крови и характеризуется высокой экспрессией маркеров зрелого фенотипа (в том числе CD16/Fc $\gamma$ RIIIa, необходимого для активации антител-зависимой цитотоксичности). В отличие от CD56<sup>dim</sup>, CD56<sup>bright</sup> НК-клетки представляют минорную популяцию в периферической

крови, но численно они преобладают в организме, поскольку составляют основную долю NK-клеток вторичных лимфоидных органов и других тканей. Кроме того, они характеризуются отсутствием или низкой экспрессией CD16 (CD16dim/neg) и низкой цитотоксической активностью. Вместе с тем для CD56bright NK-клеток описана высокая способность к продукции цитокинов и хемокинов (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF, IL-10, IL-13, CCL3, CCL4), поэтому их ключевой функцией принято считать модулирование активности других клеток врожденного и адаптивного иммунитета (Justo *et al.*, 2014; Burke *et al.*, 2015; Riley *et al.*, 2015; Michel *et al.*, 2016;). После 2016 года стало понятно, что между CD56bright и CD56dim не существует такого четкого функционального разделения на иммунорегуляторные и цитотоксические и CD56bright клетки способны приобретать цитотоксичность при стимуляции определенными сочетаниями цитокинов. Их концентрация может повышаться в периферической крови (Melsen *et al.*, 2020; Saito *et al.*, 2024).

CD16-третий рецептор к Fc иммуноглобулинам (Fc $\gamma$ RIII) выявлен на мембране гранулоцитов, тучных клеток, моноцитов, макрофагов, натуральных киллеров и лимфоцитах (Balkwill *et al.*, 2005; Meza Guzman *et al.*, 2020). Fc-фрагмент антител обеспечивает цитотоксичность иммуноглобулинов, чаще может связывать IgM, IgA и IgE. Способность мембранных сигнальных и рецепторных белков передвигаться по мембране и группироваться не специфична; в клетках многих типов различные интегральные белки наружного слоя мембраны, а не только Ig, способны образовывать агрегаты, обнаруживая сходность распознающей способности с таковой у антител (Loog, 1980; Lu *et al.*, 2012). Образование комплекса различных структур с FcR инициирует контактное взаимодействие клеток, в том числе адгезию, розеткообразование, агрегацию, а также комплементзависимый лизис (Stockmeyer *et al.*, 2003; Lemke *et al.*, 2022). Рецептор взаимодействует и с агрегатом Fc-Fc (Aguilar *et al.*, 2023), со структурами, подобными антителам и T-клеточному рецептору (Gardiner, 2008; Mareeva *et al.*, 2008; Kuwahara *et al.*, 2020), а также фрагментами их деградации (Gardiner, 2008). Взаимодействие с пептидом, связанным с молекулой главного комплекса гистосовместимости (Mareeva *et al.*, 2008), оказывает ингибирующее действие на клетки путем ограничения эффекта проведения сигналов через Toll-подобные рецепторы (Glaser *et al.*, 2023).

Известно, что популяция CD56+NK клеток проявляет более высокую цитотоксическую активность, чем популяция естественных киллерных клеток, отличающихся низкой экспрессией CD16 (Lanier *et al.*, 1986; Carville *et al.*, 2013).

Имеются разные позиции в объяснении причин сбрасывания клеткой мембранных рецепторов.

Есть мнение, что сбрасывание рецепторов происходит при снижении функциональной активности, в том числе при покое клетки (Brieva *et al.*, 1990). Ряд авторов предполагает что сбрасывание рецепторов необходимо для их обновления (Ashman, 1980, 1982). Тот факт, что интенсивность формирования антигенреактивных рецепторов ассоциирована с восстановлением способности клетки к иммунному ответу, позволил утверждать, что замена рецепторов необходима клетке для ее дифференцировки (Teale *et al.*, 1981; Ashman, 1982). Наиболее широко распространено мнение, что шеддинг рецепторов осуществляют активированные клетки; установлено повышение содержания внеклеточных сигнальных молекул под влиянием интерферонов (Brieva, 1990), продуктов секреции полиморфноядерных лейкоцитов (Samodova, Dobrodeeva, 2019).

Концентрации s-форм рецепторов в крови, межклеточной жидкости, секретах и экскретах колеблются в очень широких пределах — от долей нанogramма до нескольких микрограммов в 1 мл и зависят от типов рецептора и клетки, а также объекта исследования (Novikov, 2022). Наличие внеклеточного пула рецепторных структур у практически здоровых людей свидетельствует о том, что данный процесс является физиологическим. Это, в свою очередь, ставит вопросы нормативных пределов содержания пула внеклеточных молекул и их физиологических колебаний у практически здоровых людей. Представляют интерес сведения о влиянии неблагоприятных для организма человека климатических и экстремальных условий.

Уровни содержания sCD16, sCD56 варьируются при иммунологических нарушениях или связанных с ними заболеваниях. Так, сывороточные концентрации sCD16, sCD56 повышаются при коронарной недостаточности, ревматоидном артрите, атеросклерозе, онкологии (Masuda, Takahashi, 2002; Masuda *et al.*, 2003; Firsova *et al.*, 2019; Cai *et al.*, 2022).

Представляло интерес изучить содержание иммунокомпетентных клеток крови, фагоцитарную активность нейтрофилов, концентрации цитокинов, циркулирующих иммунных комплексов и уровни циклических нуклеотидов (цАМФ и цГМФ) сыворотки крови с разным уровнем растворимых молекул адгезии NCAM (CD56) и иммуноглобулина Fc-рецептора III (CD16) у практически здоровых людей, проживающих на Арктической территории.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено иммунологическое обследование 178 практически здоровых на момент обследования человек в возрасте от 21 до 55 лет, 112 женщин и 66 мужчин, проживающих в Мурманской (поселки Ревда и Ловозеро; 67° с.ш. и 34° в.д.) области

и на архипелаге Шпицберген (Баренцбург; 80° с.ш. и 10° в.д.). Заключение о состоянии здоровья людей делали на основании анализа медицинской документации и результатов обследования врачебной комиссией в период профилактических осмотров. Обследование проводили в утренние часы (8.00–10.00) с согласия волонтеров и в соответствии с требованиями Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации об этических принципах проведения медицинских исследований (2000 г.), утвержденными комиссией по биоэтике при ИФПА ФГБУН ФИЦКИА УрО РАН (протокол №5 от 11.02.2022). Критерии включения: 1) проживание на территории Арктической зоны Российской Федерации: Мурманская область и арх. Шпицберген; 2) заполнение информированного согласия; 3) практически здоровые на момент обследования люди. Критерий исключения: наличие в анамнезе острых и хронических заболеваний. Тип исследования ретроспективный, выборки случайные.

Комплекс иммунологического обследования включал изучение иммунограммы, фагоцитарной активности нейтрофильных лейкоцитов периферической крови. Фагоцитарную активность нейтрофильных гранулоцитов определяли с помощью тест-набора «Реакомплекс» (Россия); оценку результатов проводили по выявлению процента активных фагоцитов и фагоцитарному числу (среднее количество латексных частиц, поглощенных одним нейтрофилом, на 100 клеток) (Selvaraj et al., 1982). Дефицит активных фагоцитов регистрировали при результате менее 50%; дефицит интенсивности фагоцитоза определяли при уровне фагоцитарного числа менее 4.

Изучено содержание клеток с рецепторами CD3+, CD4+, CD8+, CD10+, CD16+, CD56+, CD25+, CD71+, HLA DR II, CD95+) в периферической крови методом непрямой иммунопероксидазной реакции с использованием моноклональных антител («Сорбент», г. Москва) и клеток с рецепторами CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3+CD25+, CD3+HLA DR+, CD3+CD16+CD56+, CD3-CD16+CD56+ методом проточной цитометрии с помощью аппарата Epics XL фирмы Beckman Coulter (США) реактивами «Immunotech a Beckman Coulter Company» (Франция).

В сыворотке крови методом иммуноферментного анализа на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Evolis» («Bio-RAD», Германия) согласно протоколам производителей изучали концентрации свободных sCD16, sCD56 («Elisa Kit», США), цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 («Bender MedSystems», Германия), циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) «Assay Design», США. Концентрации циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) к IgA, IgM, IgG исследовали

методом преципитации с использованием 3.5; 4.0; 7.5% ПЭГ-6000; реакцию оценивали на автоматическом анализаторе «Evolis» фирмы «Bio-RAD» (Германия).

Для изучения взаимосвязи концентрации в крови сывороточных рецепторов (sCD56, sCD16) и соответствующих их мембранных форм (CD56+, CD16+) с содержанием лимфоцитов с определенными маркерами дифференцировки, активизации и апоптоза, цитокинов, циркулирующих иммунных комплексов, аденилатциклазной активностью сыворотки крови исходные значения в базе данных разделили на выборки с низким и высоким содержанием свободных sCD56 и sCD16 относительно Q1 и Q4-квартиля.

Математический анализ результатов исследования проводили с использованием пакета прикладных программ «Microsoft Excel 2010» и «Statistica 7.0» («StatSoft», США). Проверка законов распределения значений иммунологических показателей выполняли с использованием критерия Пирсона. По каждому из перечисленных показателей рассчитаны параметры описательной статистики (M – среднее арифметическое значение,  $\sigma$  – стандартное отклонение, m – стандартная ошибка среднего, R – размах, W – коэффициент вариации, границы 95%-го доверительного интервала, показатель корреляции – r). Статистическая значимость различий присваивалась при значении  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методом множественного корреляционного анализа установлено, что увеличение содержания в сыворотке крови sCD56 и sCD16 ассоциировано с повышением концентраций циркулирующих в периферической венозной крови CD56+ ( $r = 0.52$ ;  $p = 0.0029$ ) и CD16+ ( $r = 0.51$ ;  $p = 0.0035$ ). Увеличение концентрации sCD56 происходит с повышением содержания как NK-клеток (CD3-CD16+CD56+) ( $r = 0.58$ ;  $p = 0.0021$ ), так и T-NK клеток (CD3+CD16+CD56+) ( $r = 0.50$ ;  $p = 0.0039$ ) (рис. 1, 2); повышение уровня sCD16 – без изменений со стороны содержания NK-клеток и T-NK клеток. В данной работе изучена связь уровня растворимых форм CD56 и CD16 с содержанием мембранных маркеров дифференцировки лимфоцитов, концентрациями цитокинов, циркулирующих иммунных комплексов и циклических нуклеотидов. Содержание мембранных кластеров дифференцировки и изучаемых параметров, вероятно, определяется активностью шеддинга молекул адгезии и рецепторов на поверхности клеток, в частности sCD16 и sCD56.

Как видно из табл. 1, более высокий уровень sCD56 ассоциирован с большим количеством

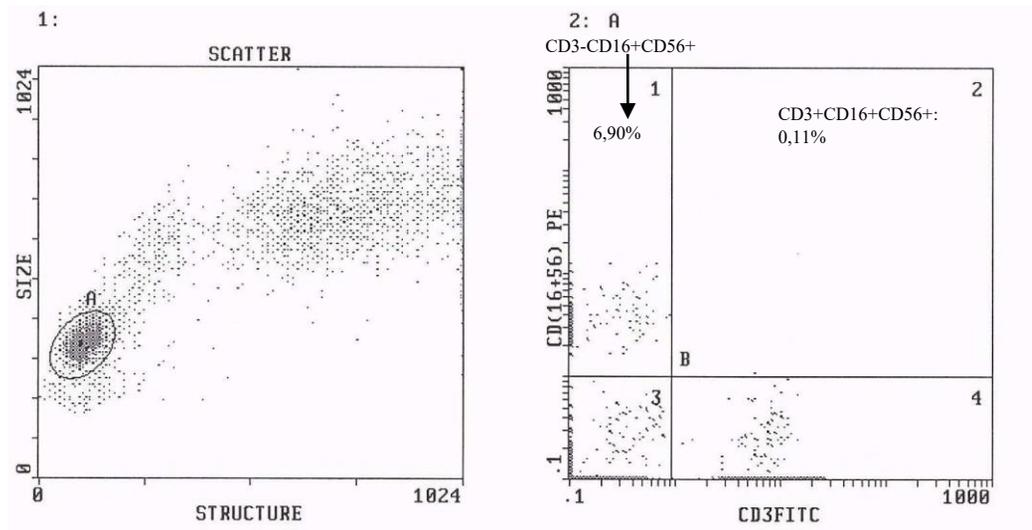


Рис. 1. Пример цитофлуорограммы при идентификации субпопуляций CD3+CD16+CD56+ (регион B2) и CD3-CD16+CD56+ (регион B1) при уровне sCD56 < 16 нг/мл.

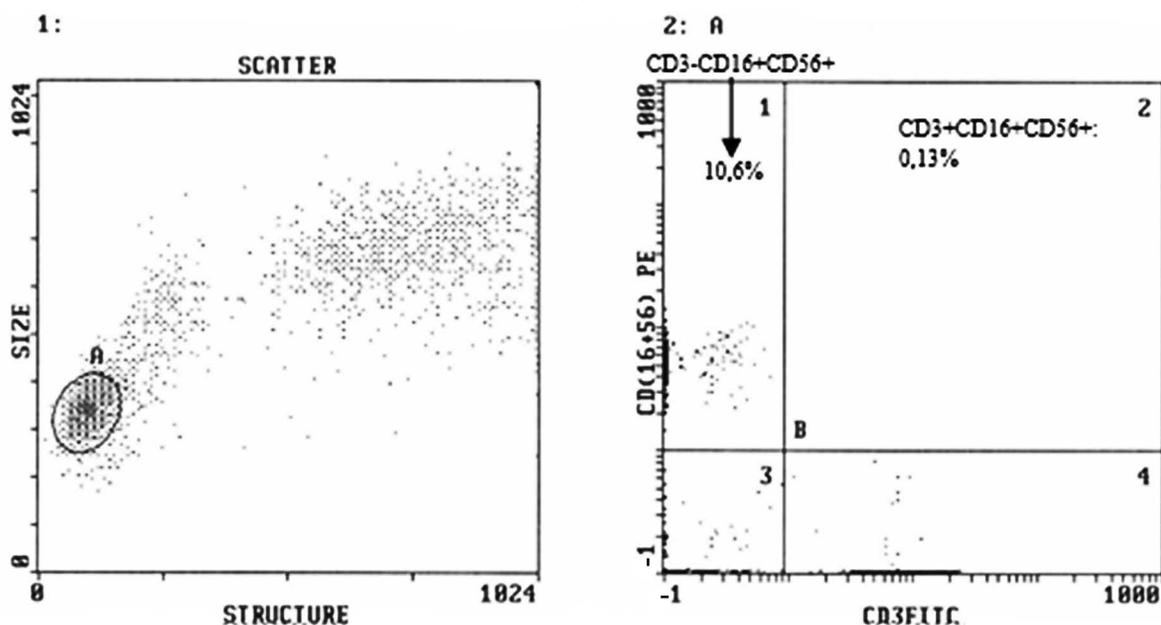


Рис. 2. Пример цитофлуорограммы при идентификации субпопуляций CD3+CD16+CD56+ (регион B2) и CD3-CD16+CD56+ (регион B1) при уровне sCD56 > 25 нг/мл.

клеток, имеющих на своей поверхности CD10 ( $r = 0.90$ ,  $p = 0.0012$ ), который является маркером лимфобластных клеток и представляет собой цинк-зависимую протеазу неприлизин. Возможно, увеличение пула клеток CD10+ и является одной из причин увеличения концентрации sCD56. Более того повышенный уровень sCD56 ассоциирован с увеличением содержания в сыворотке крови провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  ( $r = 0.65$ ,  $p = 0.014$ ),

IL-6 ( $r = 0.64$ ,  $p = 0.012$ ) и TNF- $\alpha$  ( $r = 0.54$ ,  $p = 0.032$ ). Вероятно, это может отражать повышенный провоспалительный статус у людей, имеющих более высокие концентрации sCD56. Но при этом пока сложно сказать, как эти процессы согласуются с точки зрения сигнальных путей. Известно, что как раз повышение провоспалительных цитокинов может быть причиной активации провоспалительных сигнальных путей и активизации шединга рецепторов.

**Таблица 1.** Содержание в крови иммунокомпетентных клеток, концентрации цитокинов, циркулирующих иммунных комплексов и циклических нуклеотидов в зависимости от уровня sCD56 и sCD16 у практически здоровых лиц, проживающих на арктической территории (M±m)

Показатель	sCD56 <16 нг/мл	sCD56 >25 нг/мл	sCD16 <1 нг/мл	sCD16 >5 нг/мл
	15.92±1.35 (n=38)	41.20±6.56 (n=45)	0.57±0.14 (n=43)	8.23±0.90 (n=46)
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> кл/л	5.32±0.38	5.54±0.37	5.46±0.40	5.08±0.27**
Нейтрофильные гранулоциты, 10 <sup>9</sup> кл/л	2.59±0.25	2.65±0.26	2.59±0.31	2.60±0.27
Процент активных фагоцитов, %	68.89±4.12	73.49±4.88	72.80±2.85	73.15±2.69
Фагоцитарное число, шт.	4.49±0.65	4.28±0.47	5.14±1.03	3.97±0.99*
Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> кл/л	2.32±0.20	2.46±0.36	2.40±0.29	2.05±0.23**
Моноциты, 10 <sup>9</sup> кл/л	0.29±0.06	0.30±0.04	0.34±0.05	0.28±0.04*
Эозинофилы, 10 <sup>9</sup> кл/л	0.12±0.03	0.13±0.03	0.13±0.05	0.11±0.04
CD3+, 10 <sup>9</sup> кл/л	0.67±0.05	0.76±0.06*	0.98±0.11	0.66±0.07***
CD4+, 10 <sup>9</sup> кл/л	0.49±0.04	0.56±0.05	0.64±0.06	0.35±0.06***
CD3+CD4+, 10 <sup>9</sup> кл/л	0.53±0.05	0.56±0.06	0.67±0.05	0.38±0.07***
CD8+, 10 <sup>9</sup> кл/л	0.40±0.04	0.45±0.05	0.49±0.06	0.32±0.05**
CD3+CD8+, 10 <sup>9</sup> кл/л	0.38±0.05	0.42±0.03	0.52±0.05	0.35±0.04**
CD10+, 10 <sup>9</sup> кл/л	0.44±0.07	0.66±0.09**	0.51±0.10	0.35±0.07**
CD16+, 10 <sup>9</sup> кл/л	0.47±0.05	0.53±0.08	0.42±0.08	0.55±0.09*
CD71+, 10 <sup>9</sup> кл/л	0.42±0.05	0.48±0.06	0.44±0.07	0.26±0.05***
CD25+, 10 <sup>9</sup> кл/л	0.44±0.04	0.40±0.06	0.40±0.07	0.32±0.03*
CD3+CD25+, 10 <sup>9</sup> кл/л	0.45±0.03	0.42±0.04	0.42±0.05	0.33±0.04*
CD56+, 10 <sup>9</sup> кл/л	0.32±0.07	0.51±0.09***	0.61±0.10	0.43±0.09**
CD3+CD16+CD56+, 10 <sup>9</sup> кл/л	0.11±0.02	0.23±0.03***	0.24±0.05	0.21±0.04
CD3-CD16+CD56+, 10 <sup>9</sup> кл/л	0.29±0.06	0.46±0.07**	0.38±0.08	0.35±0.07
HLA DR II, 10 <sup>9</sup> кл/л	0.36±0.04	0.45±0.05*	0.38±0.04	0.25±0.05**
CD3+HLA DR+, 10 <sup>9</sup> кл/л	0.10±0.02	0.19±0.03**	0.26±0.05	0.13±0.04***
CD95+, 10 <sup>9</sup> кл/л	0.40±0.08	0.59±0.09**	0.40±0.08	0.30±0.07**
IL-1β, пг/мл	1.46±0.53	2.19±0.46**	3.49±0.41	3.45±1.42
IL-6, пг/мл	4.92±0.35	5.25±0.20*	4.91±0.35	5.33±1.01
TNF-α, пг/мл	1.39±0.35	2.09±0.37**	7.56±0.55	7.66±1.07
IL-10, пг/мл	3.63±0.58	5.24±0.20**	5.27±0.53	4.52±0.49*
ЦИК IgA, г/л	1.45±0.56	2.45±0.49***	1.51±0.46	2.37±0.58***
ЦИК IgM, г/л	3.32±1.02	4.99±0.98**	3.72±0.87	4.81±0.94**
ЦИК IgG, г/л	6.93±2.05	10.06±2.34***	7.12±2.26	9.77±2.48***
цГМФ, пмоль/л	0.53±0.18	0.15±0.07***	0.61±0.19	0.27±0.13***
цАМФ, пмоль/л	0.11±0.02	0.07±0.01*	0.12±0.02	0.07±0.01***

Примечание. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 – достоверность различий при сравнении с низким уровнем sCD.

При увеличении концентрации sCD56 повышается уровень противовоспалительного цитокина IL-10 ( $r = 0.65$ ,  $p = 0.013$ ). IL-10 известен как естественный ингибитор экспрессии генов адгезивных, активирующих сигнальных молекул, рецепторов, лигандов, снижает уровень активности превентивного воспаления и иммунных реакций. Секреция IL-10 требует более сильной стимуляции, чем продукция цитокинов, стимулирующих активизацию иммунокомпетентных

клеток и их пролиферацию (Dhus *et al.*, 2008; Palmer *et al.*, 2011; Wilke *et al.*, 2011). Одновременное увеличение концентраций sCD56 и IL-10 является сигналом или ограничителем небезопасного для организма накопления внеклеточного пула рецепторных структур.

Влияние увеличения содержания клеток CD16+ и CD56+ и шеддинга их с мембраны на изучаемые в работе параметры заметно различаются. Так, увеличение концентрации sCD16 связано

со снижением содержания циркулирующих в крови лейкоцитов ( $r = -0.52$ ,  $p = 0.025$ ) за счет снижения общего уровня лимфоцитов ( $r = -0.78$ ,  $p = 0.0017$ ), преимущественно Т-хелперов ( $CD3+CD4+$ ;  $r = -0.91$ ,  $p = 0.0011$ ), (рис. 3, 4);

цитотоксических Т-лимфоцитов ( $CD3+CD8+$ )  $r = -0.82$ ,  $p = 0.0021$ ) (рис. 5, 6); активированных Т-лимфоцитов ( $CD3+HLADR+$ )  $r = -0.71$ ,  $p = 0.0029$ ) (рис. 7, 8, табл. 1). Незначительность сокращения концентраций циркулирующих

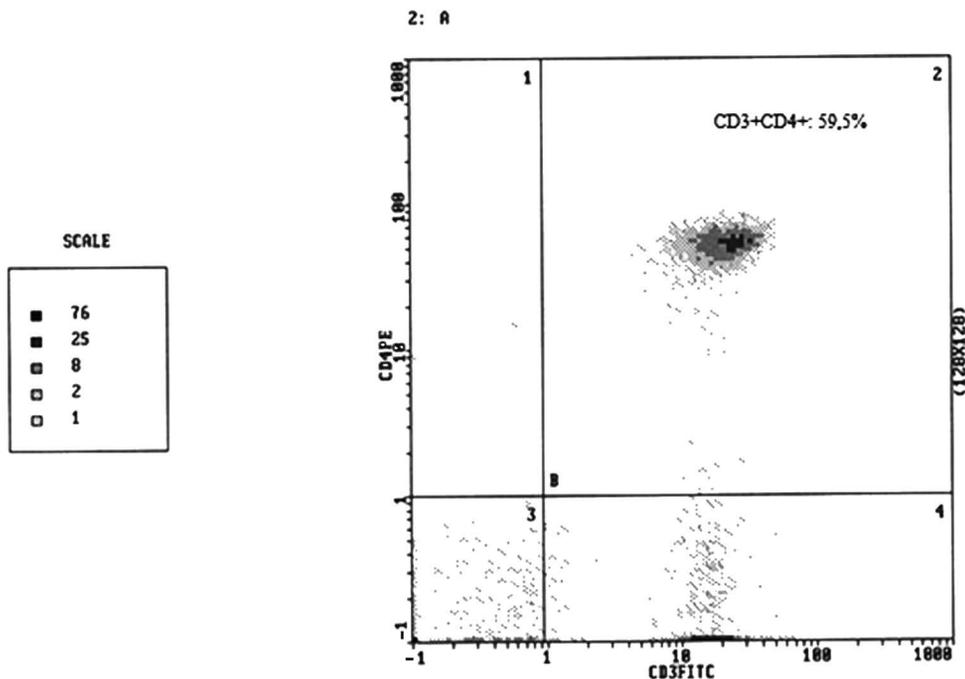


Рис. 3. Пример цитофлуорграммы при идентификации субпопуляций  $CD3+CD4+$  (регион В2) при уровне  $sCD16 < 1$  нг/мл.

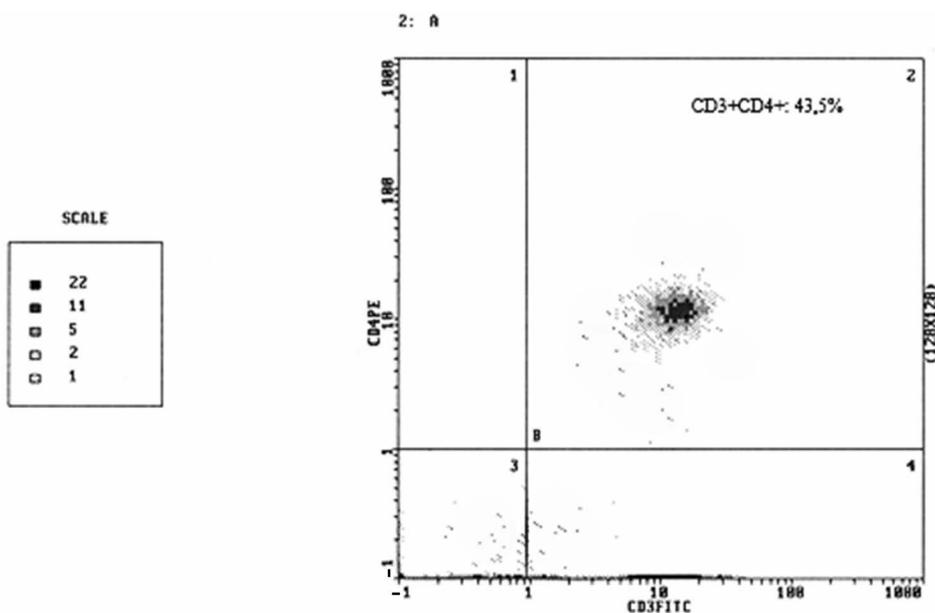


Рис. 4. Пример цитофлуорграммы при идентификации субпопуляций  $CD3+CD4+$  (регион В2) при уровне  $sCD16 > 5$  нг/мл.

моноцитов и эозинофилов вполне объяснима их малыми уровнями содержания в крови и преимущественным нахождением в тканях. Поэтому даже самые незначительные отклонения

концентраций циркулирующих в крови моноцитов и эозинофилов отражают существенные изменения функциональной активности в данных системах. Связи содержания CD16+ с количеством

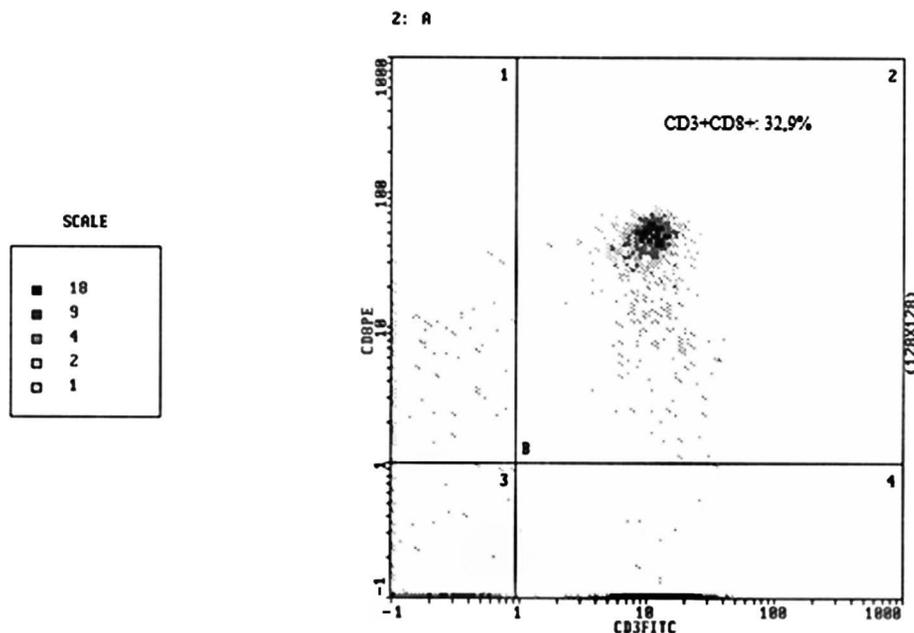


Рис. 5. Пример цитофлуорограммы при идентификации субпопуляций CD3+CD8+ (регион B2) при уровне sCD16 < 1 нг/мл.

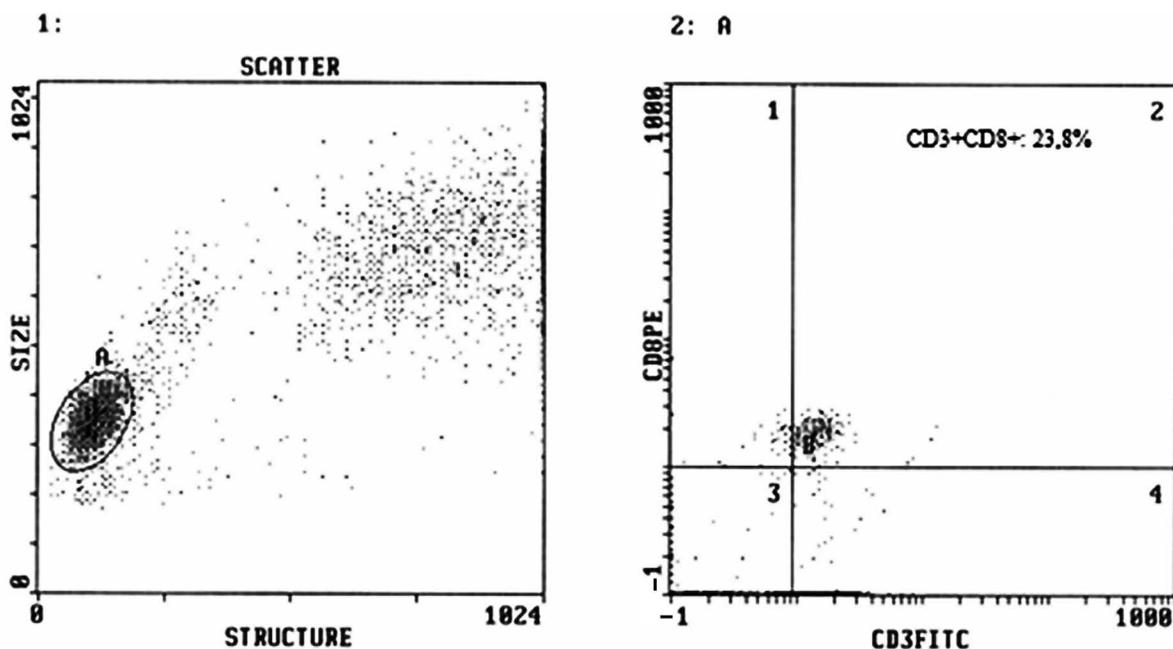


Рис. 6. Пример цитофлуорограммы при идентификации субпопуляций CD3+CD8+ (регион B2) при уровне sCD16 > 5 нг/мл.

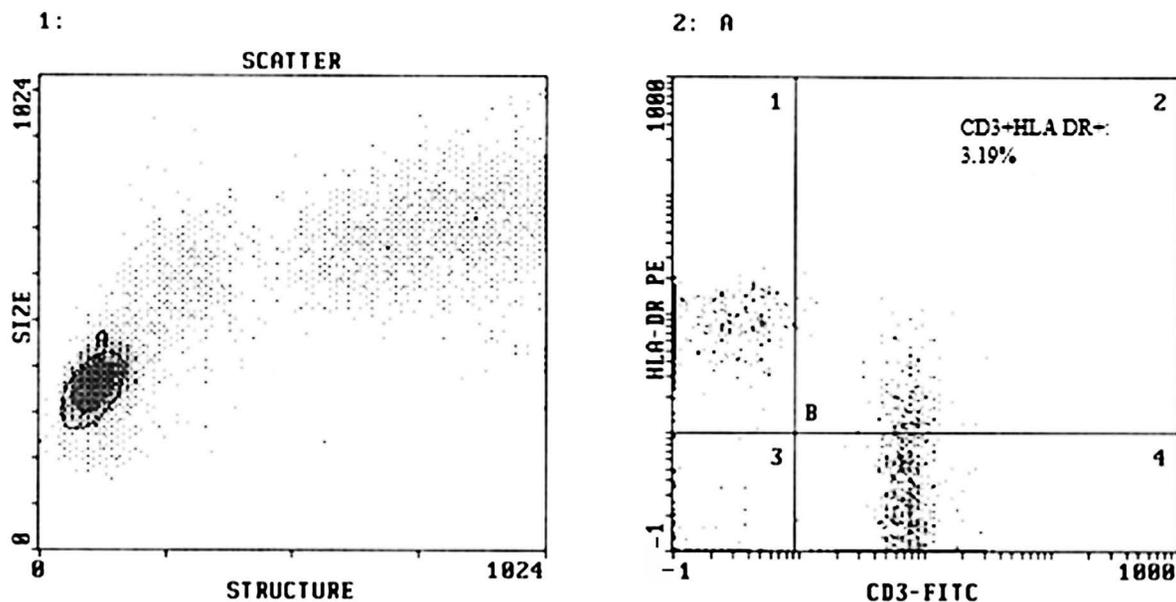


Рис. 7. Пример цитофлуорограммы при идентификации субпопуляции CD3+HLA DR+ (регион B2) при уровне sCD16 < 1 нг/мл.

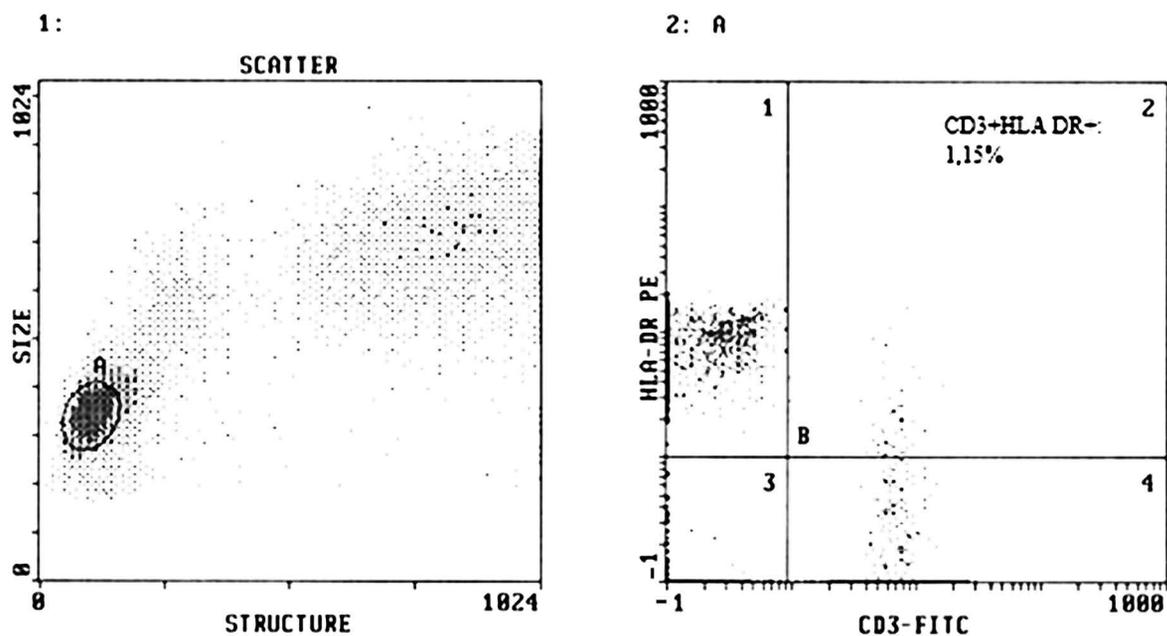


Рис. 8. Пример цитофлуорограммы при идентификации субпопуляции CD3+HLA DR+ (регион B2) при уровне sCD16 > 5 нг/мл.

циркулирующих нейтрофильных гранулоцитов и фагоцитарную их активность в данной работе не установлено. Как известно, существует 2 популяции нейтрофильных гранулоцитов: одни преимущественно фагоцитируют, другие, в основном, обеспечивают антителозависимый лизис.

Концентрации циркулирующих иммунных комплексов повышаются параллельно с увеличением уровней содержания sCD16 и sCD56 ( $r = 0.83-0.92$ ,  $p = 0.0012-0.0015$ ). Известно, что образование иммунных комплексов является физиологической реакцией, в которой кроме специфического

связывания антиген – антитело присутствует и неспецифическое взаимодействие между Fc-структурами. Рецепторы к Fc имеют практически все клетки, они связывают агрегированные Ig или иммунные комплексы. Иницирующее действие комплексов включает активацию компонентов плазмы и фактора Хагемана. Последствием реакций с участием комплексов является адгезия комплексов на нейтрофилах, макрофагах, эритроцитах, тромбоцитах, других клетках. При активизации таким путем происходит агрегация клеток с формированием кластеров и розеток. При контакте с кластерами миелоидного ряда происходит освобождение различных протеолитических ферментов и активных форм кислорода (Theofilopoulus, Dixon, 1980; Starikova *et al.*, 2005), а также кислых гидролаз, катепсинов и коллагеназ (Belchenko, 2013). Лизис клеток, входящих в кластер, осуществляется всеми видами образующих их клеток (Belchenko, Krivosheina, 1999). Способность к формированию различных комплексов является распространенной и общей в биологических системах и касается самых разнообразных по происхождению структур и транспортных комплексов. Белки острой фазы СРБ, САА и апоА циркулируют в крови уже в ассоциации с разными классами липопротеинов (Krug *et al.*, 1972). И хотя функциональный смысл таких ассоциаций не всегда и не вполне понятен, ясно одно: формирование комплексов направлено на устранение аномального отклонения в концентрации того или иного компонента внеклеточной среды.

Увеличение содержания циркулирующих лейкоцитов CD16+ и CD56+ и шеддинга изучаемых кластеров дифференциации происходит на фоне параллельного снижения концентраций цАМФ и цГМФ ( $r = 0.54-0.57$ ;  $p = 0.029-0.035$ ).

Модификация активности клетки на внешние сигналы осуществляется аденилатциклазной системой путем активации каталитической и регуляторной субъединиц протеинкиназ. Регуляторная субъединица является рецептором к цАМФ; без сигнала извне комплекс каталитической и регуляторной частей неактивен. Но как только цАМФ присоединяется к регуляторной субъединице, комплекс диссоциирует, что обнажает активные группы. Активные группы аденилатциклазы превращает АТФ в 3'5'АМФ, который обеспечивает активацию протеинкиназ. Система гуанилатциклазы является антагонистом цАМФ: цАМФ угнетает движение, деление клетки, а цГМФ – стимулирует эти процессы (Kanda, Watanabe, 2001; Tasken, Skokka, 2006).

Количество эффектов, реализуемых через цАМФ, огромно. Они ассоциированы с активацией глюконеогенеза, липолиза, кетогенеза, синтеза РНК, ДНК и роста клеток, секреции

практически всех гормонов, серотонина, гистамина, ацетилхолина, лизосомальных ферментов и транспорта ионов (Lebedev *et al.*, 1999; Artyukhov, 2010; Yurieva, Dubrovina, 2012; Pukhteeva *et al.*, 2017). Механизмы действия цАМФ многообразны, в ряде случаев они очень сложны и не всегда прямо опосредованы стимуляцией аденилатциклазы. Система аденилатциклазы может оказывать влияние на процессы биосинтеза, независимо от РНК-полимеразы, путем воздействия на гистоны и рибосомальные белки.

Хотя ответ клеток и будет координироваться наличием и передачей цАМФ, уровень активации клетки и ее характер будут зависеть от концентрации клеточной макромолекулы, с которой взаимодействует цАМФ. При недостаточности необходимых в реакции макромолекул активация только немногих клеток приведет к усиленному ответу (Shevchenko, 1990; Yurieva, Dubrovina, 2012). Пока в данной работе мы можем только констатировать факт параллельного снижения (фактически двукратного) концентраций внеклеточных цАМФ и цГМФ при увеличении количества клеток CD56+ и CD16+, что, возможно, будет способствовать повышению функциональной активности этих мембранных маркеров. Содержание внеклеточной цАМФ и цГМФ всегда выше (в 3–10 раз) и практически никогда не приближается к внутриклеточным уровням. Внутренняя и внешняя концентрации определяются выделением аденилатциклаз против градиента концентрации из цитозоля и не зависят от внутриклеточного метаболизма (Werner *et al.*, 2011). Этот односторонний процесс активизируется АТФ и зависит от концентрации циклических нуклеотидов в клетке. Таким образом, внутриклеточные концентрации циклических нуклеотидов в клетке зависят от простой диффузии, реактивных изменений мембраны и энергетического ресурса. Отсутствие изменений концентраций цГМФ указывает на то, что повышение содержания клеток CD56+ и CD16+, а также уровня их шеддинга в пределах колебаний, полученных в данной работе, не нарушает гомеостаза, хотя и обуславливает адаптивные реакции по его сохранению.

Внеклеточный цАМФ может быть источником внеклеточного аденозина, который поддерживает баланс регуляторных и эффекторных Т-лимфоцитов. Т.е. истощение внеклеточного пула цАМФ может быть причиной изменения соотношения этих клеток и оказывать влияние на про- или противовоспалительный статус организма. По результатам, представленным в таблице 1, снижение уровня цАМФ в группе людей с более высокой концентрацией sCD16 сопровождается и снижением содержания в сыворотке крови IL-10 ( $r = 0.52$ ,  $p = 0.034$ ), который является естественным ингибитором иммунной реакции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, увеличение концентрации в сыворотке крови sCD56 и sCD16 у практически здоровых взрослых лиц трудоспособного возраста ассоциировано с повышением содержания циркулирующих моноклеаров с соответствующими мембранными кластерами. Увеличение концентрации sCD56 происходит с повышением содержания NK-клеток (CD3-CD16+CD56+) и T-NK клеток (CD3+CD16+CD56+).

У жителей Арктики одновременное увеличение концентраций sCD56 и IL-10 является сигналом небезопасного для организма накопления внеклеточного пула рецепторных структур. Повышенные концентрации циркулирующих в крови sCD16, sCD56 нарушают транспорт и клиренс ЦИК.

Мембранный CD56 проводит сигнал активизации секреторной деятельности клетки с увеличением концентраций в сыворотке крови цитокинов и иммуноглобулинов; инициирует взаимодействие клетки с иммуноглобулинами. Предположительно, взаимодействие mCD16 и sCD16 с иммуноглобулинами обуславливает снижение содержания циркулирующих в крови лимфоцитов преимущественно Т-хелперов (CD3+CD4+), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+), активированных Т-лимфоцитов (CD3+HLADR+) и увеличение в сыворотке крови концентраций ЦИК.

Вероятно, активизация проведения сигнала через CD56 и CD16 и их шеддинг происходит на фоне параллельного фактически двукратного снижения концентраций внеклеточных цАМФ и цГМФ, что влечет за собой для клеток иммунной системы снижение концентраций этих молекул в периферической крови.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках программы фундаментальных научных исследований ФГБУН ФИЦКИА УрО РАН “Механизмы взаимодействия системных и местных иммунных реакций у лиц, работающих в условиях Арктики (пос. Баренцбург арх. Шпицберген, пос. Ревда и Ловозеро Мурманской области)” (номер государственной регистрации: 122011800217-9).

## БИОЭТИКА

Обследование волонтеров проводили в соответствии с требованиями Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации об этических принципах проведения медицинских исследований (2000 г.), утвержденными комиссией по биомедицинской этике при ИФПА

ФГБУН ФИЦКИА УрО РАН (протокол №5 от 11.02.2022).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abel A.V., Yang C., Thakar M.S., Malarkannan S.* Natural killer development, maturation, and clinical utilization // *Frontiers in Immunology*. 2018. V. 9. P. 1869. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01869
- Aguilar O.A., Gonzalez-Hinojosa M.D.R, Arakawa-Hoyt J.S. et al.* The CD16 and CD32b Fc-gamma receptors regulate antibody-mediated responses in mouse natural killer cells // *J. Leukoc. Biol*. 2023. V. 113. № 1. P. 27–40. DOI: 10.1093/jleuko/qiac003
- Artyukhov V.G.* Secondary messengers cAMP, Ca<sup>2+</sup>, NO – modulate the functional properties of lymphocytes under UV irradiation // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2010. V. 12. P. 637–641.
- Ashman R.F.* Accelerated loss and replacement of receptors on antigen-binding cells after immunization // *Journal of Immunology*. 1980. V. 124. P. 893–904.
- Ashman R.F.* Immunological role of antigenbinding cell // *Immunology Today*. 1982. V. 3. P. 349–352.
- Balkwill F., Charles K., Mantovani A.* Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease // *Cancer Cell*. 2005. V. 7. № 3. P. 211–217. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.02.013
- Belchenko D.I.* Functional system of non-lymphoid cells in erythrocyte clearance of circulating immune complexes // *Immunology*. 2013. V. 34. P. 88–90.
- Belchenko D.I., Krivosheina E.L.* Exocytic lysis of erythrocytes by megakaryocytes in bone marrow erythroclastic clusters and autoregots in acute lymphoblastic leukemia. // *Hematology and transfusiology*. 1999. V. 44. № 5. P. 18–21.
- Brieva J.A., Villar L.M., Leoro G., Alvarez-Cermeño J.C., Roldán E., Gonzalez-Porqué P.* Soluble HLA class I antigen secretion by normal lymphocytes: relationship with cell activation and effect of interferon-gamma // *Clinical and Experimental Immunology*. 1990. V. 82. № 2. P. 390–395. DOI: 10.1111/j.1365-2249.1990.tb05459.x
- Burke S.D., Seaward A.V.C., Ramshaw H., Smith G.N., Virani S., Croy B.C., Lima P.D.A.* Homing receptor expression is deviated on CD56+ blood lymphocytes during pregnancy in Type 1 diabetic women // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 3. P. e0119526. DOI: 10.1371/journal.pone.0119526
- Cai H., Kakiuchi-Kiyota S., Hendricks R., Zhong S., Liu L., Adedeji A.O., Chan P., Schutten M.M., Kamath A.V.,*

- Ovacik M.A.* Nonclinical Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Translational Model of RO7297089, A Novel Anti-BCMA/CD16A Bispecific Tetravalent Antibody for the Treatment of Multiple Myeloma // *AAPS J.* 2022. V. 24. № 6. P. 100.  
DOI: 10.1208/s12248-022-00744-8
- Carville A., Evans T.J., Reeves R.K.* Characterization of circulating natural killer cells in neotropical primates // *PLoS. One.* 2013. V. 8. № 11. P. e78793.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0078793
- Crinier A., Narni-Mancinelli E., Ugolini S., Vivier E.* SnapShot; Natural Killer Cells // *Cell.* 2020. V. 180. № 6. P. 1280–1286.  
DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.029
- Dhus O., Bunk S., Aulock S., Hermann C.* IL-10 release requires stronger toll-like receptors 4-triggering than TNF: a possible explanation for the selective effects of heterozygous TLR4 polymorphism Asp(299)Gly on IL-10 release // *Immunology.* 2008. V. 213. № 8. P. 621–627.  
DOI: 10.1016/j.imbio.2008.03.001
- Euchner J., Sprissler J., Cathomen T.* Natural Killer Cells Generated From Human Induced Pluripotent Stem Cells Mature to CD56brightCD16+NKp80+/-In-Vitro and Express KIR2DL2/DL3 and KIR3DL1 // *Front Immunol.* 2021. V. 4. № 12. P. 640672.  
DOI: 10.3389/fimmu.2021.640672.
- Firsova M.V., Mendeleeva L.P., Kovrigina A.M., Savchenko V.G.* Expression of adhesion molecule CD56 in tumor plasma cells in bone marrow as a prognostic factor in multiple myeloma // *Clinical oncohematology.* 2019. V. 12. № 4. P. 377–384.  
DOI: 10.21320/2500-2139-2019-12-4-377-384
- Gardiner C.M.* Killer cell immunoglobulin-like receptors on NK cell: the how, where and why // *International Journal of Immunogenetics.* 2008. V. 35. № 1. P. 1–8.  
DOI: 10.1111/j.1744-313X.2007.00739.x
- Gong P., Metrebian F., Dulau-Florea A., Wang Z-X., Bajaj R., Gulati G., Peiper, S.C., Gong J.Z.* Aberrant expression of CD56 on granulocytes and monocytes in myelo-proliferative neoplasm // *Journal of Hematopathology.* 2013. V. 6. № 3. P. 127–134.
- Glaser K., Kern D., Speer C.P., Schlegel N., Schwab M., Thome U.H., Härtel C., Wright C.J.* Imbalanced Inflammatory Responses in Preterm and Term Cord Blood Monocytes and Expansion of the CD14+CD16+ Subset upon Toll-like Receptor Stimulation // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 5. P. 4919.  
DOI: 10.3390/ijms24054919
- Justo G.A., Bitencourt M.A., Pasquini R., Castelo-Branco M.T.L., Almeida-Oliveira A., Diamond H.R., Rumjanek V.M.* Immune status of Fanconi anemia patients: decrease in T CD8 and CD56dim CD16+ NK lymphocytes // *Ann Hematol.* 2014. V. 93. № 5. P. 761–767.  
DOI: 10.1007/s00277-013-1953-4
- Kanda N., Watanabe S.* Intracellular 3''5''-adenosine cyclic monophosphate level regulates house dust milte-induced interleukin-13 production by T-cells from mite-sensitive patients with atopic dermatitis // *Journal of Investigative Dermatology.* 2001. V. 116. № 1. P. 3–11.  
DOI: 10.1046/j.1523-1747.2001.01196.x
- Krug U., Krug F., Cuatrecasas P.* Emergence of insulin receptors on human lymphocytes during in vitro transformation. Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A. 1972. V. 69. № 9. P. 2604–2608.  
DOI: 10.1073/pnas.69.9.2604
- Kussick S.J., Wood B.L.* Using 4-color flow cytometry to identify abnormal myeloid populations // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine.* 2003. V. 127. № 9. P. 1140–1147.  
DOI: 10.5858/2003-127-1140-UCFCTI
- Kuwahara A., Nagai K., Nakanishi T., Kumagai I., Asano R.* Functional Domain Order of an Anti-EGFR × Anti-CD16 Bispecific Diabody Involving NK Cell Activation // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 23. P. 8914.  
DOI: 10.3390/ijms21238914
- Lanier L.L., Le A.M., Civin C.I., Loken M.R., Phillips J.H.* The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes // *J. Immunol.* 1986. V. 136. № 12. P. 4480–4486.
- Lemke M.M., Theisen R.M., Bozich E.R., McLean M.R., Lee C.Y., Lopez E., Rerks-Ngarm S., Pitisuttithum P., Nitayaphan S., Kratochvil S., Wines B.D., Hogarth P.M., Kent S.J., Chung A.W., Arnold K.B.* A Quantitative approach to unravel the role of host genetics in IgG-FcγR complex formation after vaccination // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. P. 820148.  
DOI: 10.3389/fimmu.2022.820148
- Li T., Gao N., Cui W., Zhao L., Pan L.* Natural killer cells and their function in Takayasu's arteritis // *Clin. Exp. Rheumatol.* 2020. V. 124. № 2. P. 84–90.
- Lebedev O.E., Krutetskaya Z., Krutetskaya N.I.* The role of the adenylate cyclase system of regulation of Ca++ signals induced by purineergic agonists inhibitors of endoplasmic Ca-ATPases in rat peritoneal macrophages. Mater. 2nd Congress of Biophysicists of Russia: M, 1999. 333 p.
- Loor F.* Plasma membrane and cell cortex interactions in lymphocyte functions // *Advances in Immunology.* 1980. V. 30. № 1. P. 120.  
DOI: 10.1016/s0065-2776(08)60194-7
- Lu J., Marian K.D., Mold K., Du Clos T.W., Sun P.D.* Pentraxins and Fc-receptors // *Immunological Reviews.* 2012. V. 250. № 1. P. 230–238.  
DOI: 10.1111/j.1600-065X.2012.01162.x
- Mareeva T., Martinez-Hacktrt E., Sykulev Y.* Haw a T cell receptor-like antibody recognizes major histocompatibility complex-bound peptide // *Journal of Biological Chemistry.* 2008. V. 283. № 43. P. 29053–29059.  
DOI: 10.1074/jbc.M804996200
- Masuda M., Morimoto T., Kobatake S., Nishimura N., Nakamoto K., Dong X.H., Komiyama Y., Ogawa R., Takahashi H.* Measurement of soluble Fcg receptor type IIIa derived from macrophages in plasma: increase

- in patients with rheumatoid arthritis // *Clin. Exp. Immunol.* 2003. V. 132. № 3. P. 477–484.  
DOI: 10.1046/j.1365-2249.2003.02168.x
- Masuda M., Takahashi H.* Increase of soluble Fc gamma RIIIa derived from macrophages in plasma from patients with atherosclerosis // *Rinsho Byori.* 2002. V. 50. № 5. P. 502–505.
- Meza Guzman L.G., Keating N., Nicholson S.E.* Natural killer cells: tumor, surveillance and signaling // *Cancers.* 2020. V. 12. № 4. P. 952.  
DOI: 10.3390/cancers12040952
- Melsen J.E., Themeli M., van Ostaaijen-Ten Dam M.M., van Beelen E., Lugthart G., Hoeben R.C., Marco W Schilham M., Mikkers H.M.* Protocol for Isolation, Stimulation and Functional Profiling of Primary and iPSC-derived Human NK Cells // *Bio Protoc.* 2020. V. 10. № 23. P. e3845.  
DOI: 10.21769/BioProtoc.3845.
- Michel T., Poli A., Cuapio A., Briquemont B., Iserentant G., Ollert M., Zimmer J.* Human CD56bright NK Cells: An Update // *J. Immunol.* 2016. V. 196. № 7. P. 2923–2931.  
DOI: 10.4049/jimmunol.1502570.
- Novikov V.V.* Soluble differentiation molecules in inflammatory processes (The second life of proteins) / *Nizhny Novgorod: Gladkova O.V. "Publishing Salon", 2022. 212 p.*
- Palmer M.J., Mahajan V.S., Chen J., Irvine D.J., Lauffenburger D.A.* Signaling thresholds govern heterogeneity in IL-7-receptor-mediated responses of naive CD8+ T-cells // *Immunol. And cell Biol.* 2011. V. 89. № 5. P. 581–594.  
DOI: 10.1038/icc.2011.5
- Pukhteeva I.V., Gerasimovich N.V., Rybachenok D.S.* Functioning of the cyclic nucleotide system under extracellular exposure to physiologically active substances // *Journal of the Belarusian State University. Ecology.* 2017. V. 1. P. 40–45.
- Riley C.R., Hansen M., Brimnes M.K., Hasselbalch H.C., Bjerrum O.B., Straten P.T., Svane I.M., Jensen M.K.* Expansion of circulating CD56bright natural killer cells in patients with JAK2-positive chronic myeloproliferative neoplasms during treatment with interferon- $\alpha$  // *Eur J. Haematol.* 2015. V. 94. № 3. P. 227–234.  
DOI: 10.1111/ejh.12420
- Saito L.M., Ortiz R.C., Amôr N.G., Lopes N.M., Buzo R.F., Garlet G.P., Rodini C.O.* NK cells and the profile of inflammatory cytokines in the peripheral blood of patients with advanced carcinomas // *Cytokine.* 2024. V. 174. P. 156455.  
DOI: 10.1016/j.cyto.2023.156455
- Samodova A.V., Dobrodeeva L.K.* The correlation between the pool of free adhesion molecule receptors and the activity of the immune system in the Murmansk oblast residents // *Human Physiology.* 2019. V. 45. № 1. P. 90–97.  
DOI: 10.1134/S0362119718060105
- Selvaraj R.J., Sbarra A.J., Thomas G.B., Cetrulo C.L., Mitchell G.W.* A microtechnique for studying chemiluminescence response of phagocytes using whole blood and its application to the evaluation of phagocytes in pregnancy // *Journal of the Reticuloendothelial Society.* 1982. V. 31. № 1. P. 3–16.
- Shevchenko A.S.* Changes in adenylate cyclase activity in megakaryocytes and platelets of irradiated sheep // *Radiobiology.* 1990. V. 30. № 3. P. 308–311.
- Starikova E.A., Kiseleva E.P., Freidlin I.S.* Heterogeneity of mononuclear phagocytes: subpopulations and plasticity // *Successes of modern biology.* 2005. V. 125. № 5. P. 466–477.
- Stockmeyer B., Beyer T., Neuhuber W., Repp R., Kalden J.R., Valerius T., Herrmann M.* Polymorphonuclear granulocytes induced antibody-dependent apoptosis in human breast cancer cells // *Journal of Immunology.* 2003. V. 171. № 10. P. 5124–5133.  
DOI: 10.4049/jimmunol.171.10.5124
- Tasken K., Skokka A.J.* The molecular machinery for cAMP-dependent immunomodulation in T-cells // *Biochemical Society Transactions.* 2006. V. 34. P. 476–479.  
DOI: 10.1042/BST0340476
- Teale J.M., Liu F.-T., Katz D.H.* A clonal analysis of the IgE response and its implication with regard to isotope commitment // *J. Exp. Med.* 1981. Vol. 153. № 4. P. 783–792.  
DOI: 10.1084/jem.153.4.783
- Theofilopoulos A.N., Dixon F.J.* Immune complexes in human diseases: a review // *Am. J. Pathol.* 1980. V. 100. № 2. P. 529–594.
- Watanabe A., Togi M., Koya T., Taniguchi M., Sakamoto T., Iwabuchi K., Jr T.K., Shimodaira S.* Identification of CD56dim subpopulation marked with high expression of GZMB/PRF1/PI-9 in CD56+ interferon- $\alpha$ -induced dendritic cells // *Genes Cells.* 2021. V. 26. № 5. P. 313–327.  
DOI: 10.1111/gtc.12844
- Werner K., Schwede F., Genieser H.-G., Geiger J., Butt E.* Quantification of cAMP and cGMP analogs in intact cells: pitfalls in enzyme immunoassays for cyclic nucleotides // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 2011. V. 384. № 2. P. 169–176.  
DOI: 10.1007/s00210-011-0662-6
- Wilke C.M., Wei S., Wang L., Kryczek I., Kao J., Zou W.* Dual biological effects of the cytokines interleukin-10 and interferon- $\gamma$  // *Immunol. and Immunother.* 2011. V. 60. № 11. P. 1529–1541.  
DOI: 10.1007/s00262-011-1104-5
- Yurieva O.V., Dubrovina V.I.* The role of cyclic nucleotide signaling systems in the regulation of immuno- and pathogenesis // *Bulletin of the VSNC SB RAMS.* 2012. V. 2. № 84. P. 159–163.

**The relationship of quantitative indicators sCD56 and sCD16  
with the level of immunocompetent cells, cytokines, circulating immune complexes  
and cyclic nucleotides in practically healthy people living in the Arctic territory**

**A. V. Samodova<sup>#</sup>, L.K. Dobrodeeva, V.P. Patrakeeva**

*N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences Ave.  
Nikolsky, 20, Arkhangelsk, 163020 Russia  
<sup>#</sup>E-mail: annapoletaeva2008@yandex.ru*

We studied the content of immunocompetent blood cells, phagocytic activity of neutrophils, concentrations of cytokines, circulating immune complexes and levels of cyclic nucleotides (cAMP and cGMP) of serum with different levels of soluble adhesion molecules NCAM (CD56) and immunoglobulin Fc-receptor III (CD16) in practically healthy people living in the Arctic territory. It was found that the increase in serum concentration of sCD56 and sCD16 in practically healthy adults of working age is associated with an increase in the content of cells with the corresponding membrane receptors. The increase in sCD56 concentration occurs with an increase in the content of NK cells (CD3-CD16+CD56+) and T-NK cells (CD3+CD16+CD56+). The increase in sCD16 level is accompanied by a decrease in the content of circulating in the blood lymphocytes predominantly T-helper cells (CD3+CD4+), cytotoxic T-lymphocytes (CD3+CD8+) and activated T-lymphocytes (CD3+HLADR+). Increased sCD56 concentrations were associated with increases in pro-inflammatory IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and anti-inflammatory IL-10. Concentrations of circulating immune complexes increased with increasing sCD16 and sCD56 content. The signal conduction activity increases with increasing content of CD16+ and CD56+ leukocytes of peripheral blood and sCD56+ leukocytes and shedding of these molecules occurs against the background of decreasing concentrations of cAMP and cGMP.

*Keywords:* sCD56, sCD16, cytokines, circulating immune complexes, cAMP, cGMP.

УДК 574.45(282.247.211)

## ПЕРВИЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ В ЛИТОРАЛИ ОНЕЖСКОГО ОЗЕРА И ЕЕ РОЛЬ В ПРОДУКТИВНОСТИ ВОДОЕМА

© 2024 г. Е. В. Теканова<sup>®</sup>

Федеральный исследовательский центр “Карельский научный центр РАН”, Институт водных проблем Севера,  
просп. А. Невского, 50, г. Петрозаводск, 185000 Россия  
<sup>®</sup>e-mail: etekanova@mail.ru

Поступила в редакцию 11.01.2024 г.  
После доработки 25.03.2024 г.  
Принята к публикации 25.03.2024 г.

Впервые выполнены двухлетние сезонные исследования продукции фитопланктона в каменисто-песчаной литорали северного глубокого и холодноводного Онежского озера. Результаты исследований показали, что фотосинтез характеризуется двумя или тремя сезонными максимумами, величины которых находятся в пределах олиготрофных экосистем. Рассмотрены основные первичные продуценты, концентрация фосфора в воде, температура воды в течение вегетационного периода. Выявлены различия в сезонной динамике фотосинтеза и сходные среднесезонные и максимальные величины в сравнении с глубоководным районом озера. Показан малый вклад продукции литорального фитопланктона в первичную продуктивность экосистемы.

*Ключевые слова:* Онежское озеро, литораль, пелагиаль, фотосинтез, фитопланктон, сезонная динамика  
**DOI:** 10.31857/S1026347024060113, **EDN:** ukibig

Сведения о первично-продукционном процессе в литорали больших глубоких водоемов, относящихся к категории Великих озер мира, немногочисленны. Исследования фотосинтеза фитопланктона проводились летом в разных участках литоральной зоны Ладожского озера (Rasporov *et al.*, 1996), в подледный и летний периоды в приустьевых участках оз. Байкал (Бондаренко и др., 2020, 2022). Для Великих Американских озер проведены оценки первичной продукции в прибрежной зоне до 20–30-метровой глубины (Vollenweider, 1974; Urban *et al.*, 2005; Fahnenstiel *et al.*, 2016 и др.). Справедливо считается, что в таких водоемах роль литорали невелика с точки зрения биопродуктивности водоема в целом. Однако внешние воздействия на экосистему больших озер быстрее и сильнее проявляются именно в прибрежной зоне (Yurista *et al.*, 2016). Это связано с гидрологическими особенностями таких водоемов. Замедленный водообмен способствует сохранению стабильности основной водной массы длительное время после внешних воздействий. В то же время весной и осенью термический бар, формирующийся вследствие медленного нагревания и остывания воды, делит озеро на относительно изолированные области – прибрежную теплоактивную и глубоководную теплоинертную зоны. В теплоактивной

зоне аккумулируются поступающие в водоем аллохтонные вещества (Сабылина, 1999; Auer, Gatzke, 2004; Сабылина, Рыжиков, 2018), происходит их первичная трансформация и осаждение (Wetzel, 1993, 2001; Cotner *et al.*, 2009 и др.). Эти особенности определяют барьерную роль литоральной зоны и значение в сохранении структуры всех озерных процессов не только в условиях антропогенного воздействия, но и в результате климатических изменений. Поэтому большие глубокие озера, особенно северные, могут оказаться наиболее уязвимыми в условиях потепления климата из-за сокращения времени прохождения термобара и (или) увеличения нагрузки аллохтонных веществ.

Онежское озеро – большой северный глубоководный и холодноводный олиготрофный водоем. Его площадь составляет 9943 км<sup>2</sup>, средняя глубина 30 м, максимальная – 120 м (Ladoga and Onego..., 2010). В условиях потепления климата увеличился зимний речной сток в Онежское озеро (Калинкина и др., 2018б), что привело к возрастанию цветности воды, а также связанного с гумусом фосфора, железа, углекислого газа в прибрежных участках, особенно весной (Калинкина и др., 2019; Kalinkina *et al.*, 2020). Подобные изменения химического состава воды наблюдаются и в других водоемах гумидной зоны (Sarkkola

*et al.*, 2013; Brothers *et al.*, 2014; Bartels *et al.*, 2016 и др.). В то же время установлено, что в Онежском озере на 12 дней увеличилась продолжительность безледоставного периода (Ефремова *et al.*, 2013), в прибрежной части температура воды возросла на 2.2°C за 1959–2014 гг. (Диагноз и прогноз..., 2020), в глубоководной – на 1.6°C в течение 1991–2011 гг. (Woolway, Merchant, 2018).

Продукция фитопланктона в литоральной зоне Онежского озера ранее не изучалась. Более 70% прибрежной зоны озера представляет собой открытую незарастающую каменисто-песчаную литораль (Онежское озеро..., 2010) со слабым развитием фитоперифитона. Поэтому представляется важным оценить продукцию фитопланктона как основного продуцента в литоральной зоне. В свете представлений о барьерной функции литорали, а также в условиях современных изменений химического и термического режима водоема новые знания о закономерностях формирования биопродуктивности Онежского озера позволят улучшить существующую систему его биомониторинга (Калинкина и др., 2018а).

Целью настоящей работы было выявление закономерностей и масштабов продукции фитопланктона в каменисто-песчаной литорали Онежского озера и ее роли в первичной продуктивности водоема.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в открытой приборной незарастающей каменисто-песчаной литорали Пухтинской бухты, расположенной в западной части Онежского озера (рис. 1). Пухтинская бухта не подвергается непосредственному антропогенному воздействию, поэтому этот участок водоема можно считать условно фоновым. В бухту впадает три ручья – Железный и Черный длиной около 2 км и Матручей длиной около 1.4 км, вода которых имеет темно-коричневый цвет, что свидетельствует о ее высокой цветности и большом количестве органического углерода гумусового происхождения. Измерения фотосинтеза проводили 1 раз в 14 дней с мая по октябрь 2013 (n=10) и 2014 гг. (n=10) в 100 м от берега. Средняя глубина станции составляла 2.5 м в 2013 г. и 2.8 м в 2014 году (табл. 1).

Одновременно с измерением фотосинтеза проводили исследования видового состава, структурных и количественных характеристик фитопланктона и химического состава воды (органическое вещество, биогенные элементы). Результаты этих исследований опубликованы ранее (Чекрыжева, Калинкина, 2016; Сабылина, Рыжиков, 2018).

Скорость фотосинтеза фитопланктона определяли в поверхностном слое воды кислородным

методом (Кузнецов, Дубинина, 1989) по изменению концентрации кислорода в склянках при естественном освещении и в темноте после их суточной экспозиции в инкубаторе при температуре, соответствующей озерной воде. Пересчет единиц кислорода на углерод проводили с учетом ассимиляционного коэффициента фотосинтеза 1.25 (Бульон, 1993).

Для выявления особенностей сезонного цикла первичной продукции в литорали были привлечены данные о сезонных изменениях продукции в пелагиали озера. Сезонный ход первичной продукции в глубоководном районе озера подробно изучался в 1989–2006 гг. радиоуглеродным методом (Тимакова, Теканова, 1999; Сярки, Теканова, 2008; Теканова, Сярки, 2015). Радиоуглеродный метод измерения фотосинтеза дает закономерно более низкие величины по сравнению с кислородным (Бульон, 1993). Поэтому для сравнительного анализа использовали многолетние данные о скорости фотосинтеза в глубоководном районе за 2007–2023 гг., полученные кислородным методом. В анализ вошли станции С\_1, С\_2, С\_3, С\_4 (Центральное Онего) и станция В\_1 (Большое Онего) (n=31) со средней глубиной 68.5 м (см. рис. 1, табл. 1). Среднемноголетнюю траекторию сезонной динамики в глубоководном районе построили методом двойного сглаживания (Сярки, 2013). Способом скользящей средней проводили сглаживание ранжированного по дате ряда и по величине показателя, и по времени с осреднением 5 шагов (5 последовательно расположенных данных).

Первичную продукцию в фотическом слое воды глубоководного района рассчитывали по общепринятой формуле на основе скорости фотосинтеза в поверхностном слое воды и прозрачности (Бульон, 1983). Входящий в формулу коэффициент ослабления фотосинтеза с глубиной был экспериментально получен для Онежского озера и составил 0.29 (Тимакова, Теканова, 1999). Толщина фотического слоя в озере достигает глубины 2-х прозрачностей воды (Тимакова, Теканова, 1999). В пелагиали это глубина около 8 м, в прибрежье – 6 м (табл. 1). В месте отбора проб в литорали фотический слой ограничен глубиной около 3 м (табл. 1). Поэтому для расчета интегральной первичной продукции в литорали использовали коэффициенты ослабления фотосинтеза с глубиной, рассчитанные для конкретной глубины станции отбора проб. Прозрачность воды определяли диском Секки на глубине 5 м.

Для выполнения расчетов первичной продукции с площади литоральной зоны ее граница была условно ограничена 5-метровой изобатой. Считается, что литораль ограничивается нижней границей произрастания высшей водной растительности и фитоперифитона, а там, где нет

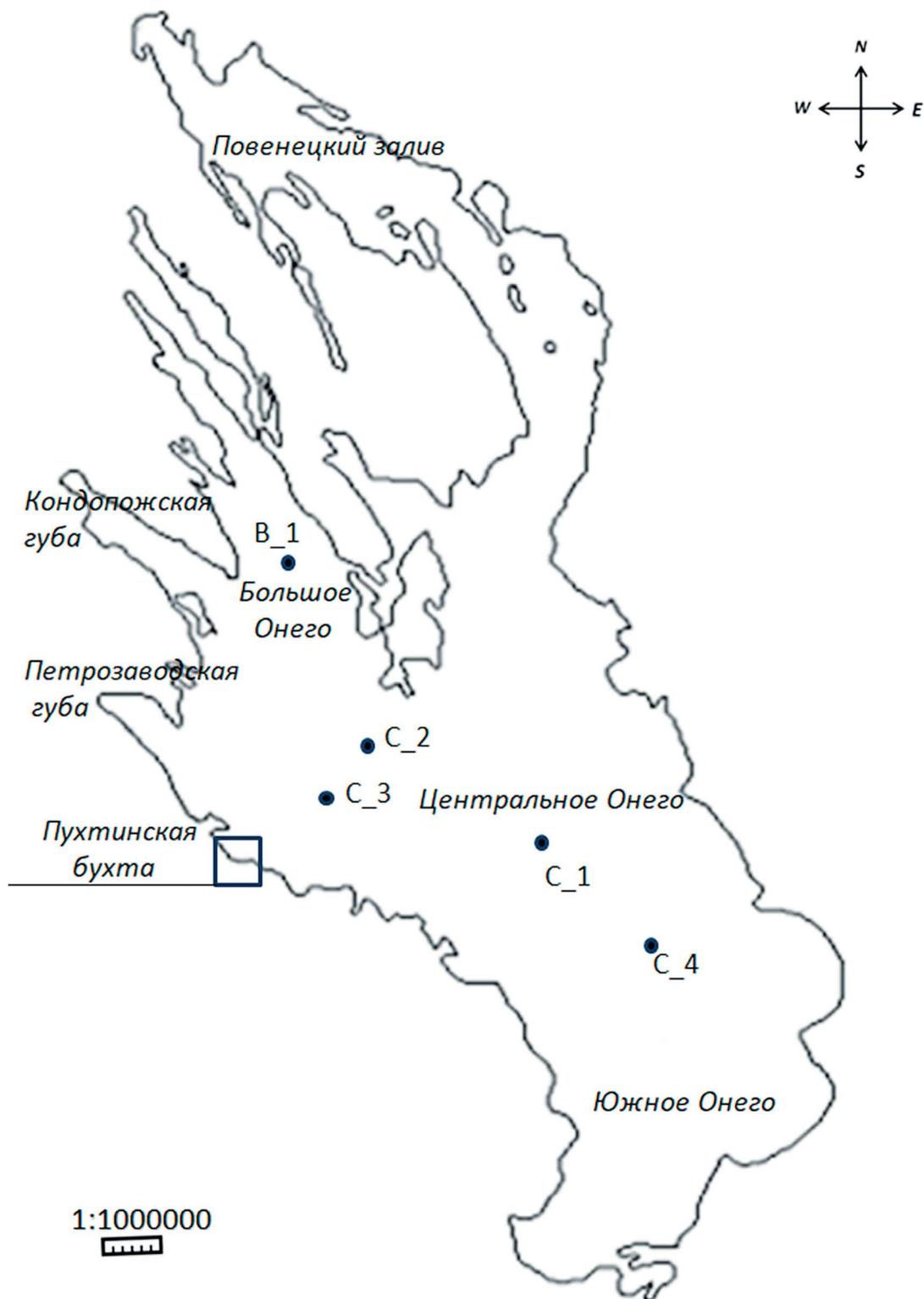


Рис. 1. Карта-схема Онежского озера с указанием мест отбора проб воды.

макрофитов – глубиной фотического слоя. Более 90% высшей водной растительности и фитоперифитона в Онежском озере встречается на глубинах

не более 3 м (Распопов, 1975; Рычкова, 1975), трофогенный слой достигает в среднем 6-метровой глубины (табл. 1).

**Таблица 1.** Статистические характеристики ( $Me \pm m$ ) измеренных параметров в литорали и пелагиали Онежского озера за период с мая по октябрь

Показатель	Каменисто-песчаная литораль		Пелагиаль
	2013 г.	2014 г.	2007–2023 гг.
Глубина, м	$2.5 \pm 0.2$	$2.8 \pm 0.2$	$68.5 \pm 5.8$
Прозрачность воды, м	$3.0 \pm 0.3$	$3.0 \pm 0.3$	$4.0 \pm 0.1$
Температура воды, °С	$14.6 \pm 2.6$	$11.7 \pm 2.8$	$11.4 \pm 2.2$
Phot*, мкг С/л·сут	$20.9 \pm 14.0$	$81.9 \pm 18.9$	$49.1 \pm 10.1$
	$48.9 \pm 17.5$		
PP**, мг С/м <sup>2</sup> ·сут	$48.5 \pm 16.2$	$148.9 \pm 31.8$	$146.3 \pm 21.3$
	$80.9 \pm 28.3$		
PP, г С/м <sup>2</sup> ·вегет. период	9.3	20.4	22.5

Примечание. \* – фотосинтез в поверхностном слое воды, \*\* – первичная продукция в фотическом слое воды.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Закономерности сезонного цикла продукции фитопланктона в открытой прибойной каменисто-песчаной литорали Онежского озера*

На территории Республики Карелия 2013 и 2014 годы характеризовались положительной аномалией среднегодовой температуры  $+2.2^{\circ}\text{C}$  и  $+2.3^{\circ}\text{C}$  соответственно. Годовое количество осадков в оба года было близким к норме, однако в 2014 г. наблюдался их дефицит летом и осенью. Вскрытие водных объектов в 2013 г. завершилось к 10 мая, в 2014 – на неделю позже. 2014 г. отличался аномально теплой зимой и низким снегообразованием, весеннее половодье было незначительным по объему и непродолжительным по времени. Слабое половодье, дефицит осадков летнего периода и преобладание повышенного температурного фона способствовали формированию пониженной водности на большинстве рек и озер Карелии в 2014 году. 2013 г. характеризовался как средний по водности год (Кравченкова, Бехтерева, 2014; Бехтерева, Кравченкова, 2015).

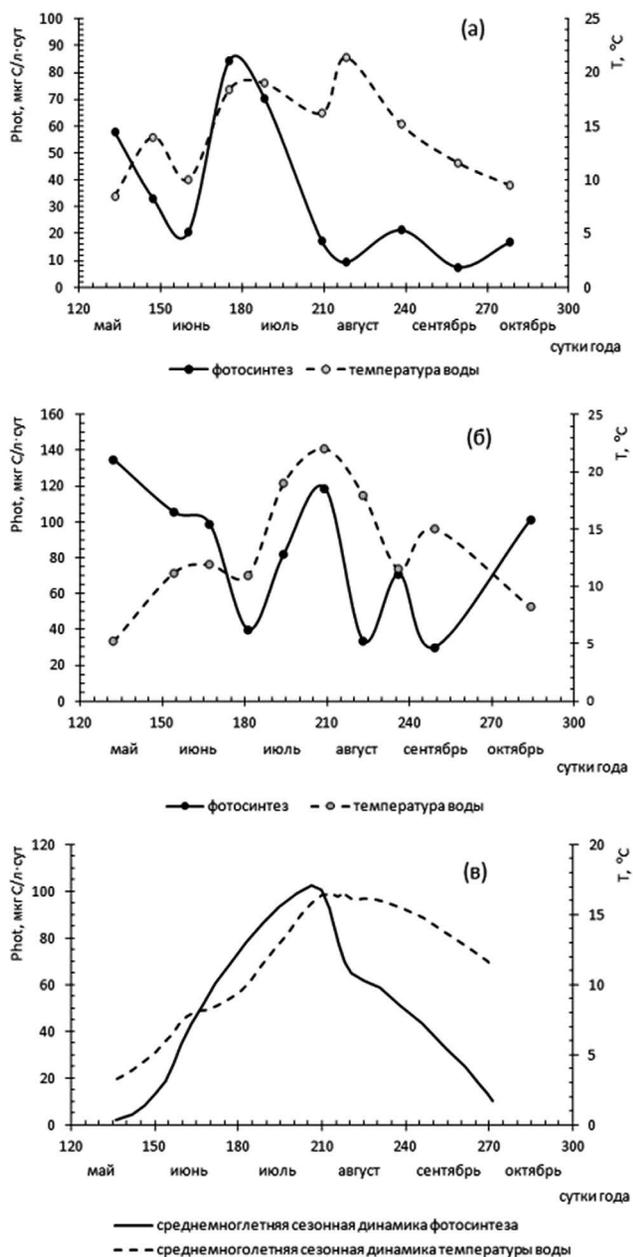
Литоральные воды в изученные годы характеризовались неравномерностью прогрева и охлаждения (рис. 2а, б). Наблюдаемые понижения температуры воды связаны с быстрым остыванием воды на мелководье при временном похолодании или стгонно-нагонных явлениях при устойчивых сильных ветрах западных направлений. Средняя за вегетационный период температура воды в 2013 г. была на  $3^{\circ}\text{C}$  выше, чем в 2014 г. (табл. 1). Сезонный максимум температуры воды в оба года достигался в конце июля–начале августа и был сходен по величине –  $+21.4^{\circ}\text{C}$  и  $+22.0^{\circ}\text{C}$  в 2013 и 2014 гг. соответственно.

В сезонной динамике фотосинтеза литорально-фитопланктона в изученные годы повторялись

два максимума – весенний и летний. В 2014 г. был ярко выражен и осенний максимум (рис. 2а, б). Сезонные возрастания скорости фотосинтеза в целом совпадали с максимальными показателями численности и биомассы фитопланктона (Чекрыжева, Калинкина, 2016).

Весенний максимум фотосинтеза наблюдался в мае (рис. 2а, б). В этот период литоральная зона находится в пределах теплоактивной зоны, отделенной от основной акватории термическим баром. Здесь были отмечены повышенные концентрации фосфора в воде, которые достигали 18–20 мкг/л, тогда как в это же время за пределами термобара в теплоинертной зоне – лишь 7–10 мкг/л (Сабылина, Рыжаков, 2018). Весенний максимум фотосинтеза обеспечивался диатомовым комплексом (около 100% сообщества), представленным, главным образом, крупноразмерной холодноводной *Aulacoseira islandica* (O. Müller) Simonsen (Чекрыжева, Калинкина, 2016). *A. islandica* во время весеннего конвективного перемешивания воды поднимается из придонных слоев и достигает максимальных сезонных величин в период гомотермии (Петрова, 1990; Padisák, 2003) при оптимальных температурных условиях вегетации в Онежском озере  $+5...+6^{\circ}\text{C}$  (Петрова, 1990). Наиболее высокого уровня, который превышал летние величины, фотосинтез достиг весной 2014 г. при температуре  $+5.2^{\circ}\text{C}$ . Весной 2013 г. при температуре воды  $+8.5^{\circ}\text{C}$ , по-видимому, начинался спад весеннего максимума фотосинтеза, так как температура уже выходила за пределы оптимальных значений для развития *A. islandica*. Интенсивная вегетация диатомовых сопровождалась значительным потреблением нитратного азота, особенно в 2014 г., когда его концентрации в воде снизились до аналитического нуля (Сабылина, Рыжаков, 2018).

Летнее возрастание скорости фотосинтеза происходило в период максимального прогрева воды



**Рис. 2.** Сезонная динамика фотосинтеза (Phot) и температуры (Т) в поверхностном слое воды открытой каменисто-песчаной литорали в 2013 (а) и 2014 (б) гг. и в пелагиали (в) Онежского озера в 2007–2023 гг.

и приходилось в 2013 г. на конец июня (рис. 2а), в 2014 г. — на конец июля в связи с более медленным прогревом воды в предшествующий период (рис. 2б). В это время литоральная зона и эпилимнион глубоководного района озера представляют собой относительно однородную по химическому составу водную массу, за исключением антропогенно эвтрофированных участков. Содержание общего фосфора в воде литорали

летом снизилось до 7–14 мкг/л (Сабылина, Рыжак, 2018) и не отличалось от его концентраций в глубоководном районе (Сабылина, 1999; Сабылина и др., 2010; Zobkov *et al.*, 2022). Основу летних альгоценозов по-прежнему составляли диатомовые водоросли, но их доля в сообществе по сравнению с весенним периодом сократилась до 75–78% в численности и 82–88% — в биомассе. В функционирование сообщества свой вклад вносили высокопродуктивные зеленые и эвгленовые водоросли. Нанопланктонная фракция достигала максимальных сезонных величин и составляла 18 и 25% в численности альгоценозов в 2013 и 2014 гг. соответственно. Массово вегетировали мелко-размерные диатомея *Cyclotella comta* (Ehrenberg) Nakansson., хлорококковые *Monoraphidium*, *Koliella* и *Chlamydomonas*, эвгленовые *Trachelomonas* (Чекрыжева, Калинин, 2016).

В августе 2013 г. в штилевую погоду при максимальной температуре воды 21.4°C наблюдалась вегетация цианобактерий *Dolichospermum crassum* (Lemmermann) Wacklin, Hoffmann et Komarek, 2009 и *Anabaena scheremetievii* Elenkin (*Dolichospermum scheremetieviae* (Elenkin) Wacklin, L. Hoffmann & Komárek), которые составляли около 80% в численности сообщества. При этом их численность не превышала 37 тыс. кл./л (Чекрыжева, Калинин, 2016). Развитие “цветения” воды в литорали ограничивалось низким содержанием фосфора в воде, вегетация цианобактерий не сопровождалась значительным увеличением фотосинтеза (рис. 2а).

Выраженный осенний максимум фотосинтеза, сопоставимый с летним, наблюдался только в 2014 г. в октябре (рис. 2б) при температуре +8.2°C и концентрации общего фосфора 7 мкг/л. Основными компонентами альгоценоза в это время были диатомовые и цианобактерии (Чекрыжева, Калинин, 2016). Во время осеннего максимума, так же как и весной, наблюдалось снижение количества нитратов почти в 2.5 раза по сравнению с летними концентрациями (Сабылина, Рыжак, 2018).

В целом, в 2014 г. скорость фотосинтеза как и интегральная продукция были в 4 и 3 раза соответственно выше, чем в 2013 году (табл. 1). Тем не менее их величины не превышали пределов олиготрофии. Показатели численности и биомассы фитопланктона в 2014 г. также были более высокими (Чекрыжева, Калинин, 2016). Возможной причиной такой межгодовой разницы может быть низкий уровень воды в 2014 году. Имеющиеся сведения о влиянии уровня воды в водоемах на планктон относятся, большей частью, к водохранилищам и свидетельствуют об увеличении показателей развития планктона в период “низкой воды” за счет более хорошего прогрева, увеличения ресуспензии осадков и более быстрого

оборота биогенных элементов (Ривьер и др., 2001). Показано, что значительные колебания уровня приводят к изменению гидростатической нагрузки на дно и, как следствие, к изменению массообмена между дном и водой. Снижение нагрузки сопровождается разуплотнением отложений и увеличением направленного в них потока воды. В случае с песчаными отложениями создается механический “промывной режим” (Мартынова, 2010). Вполне вероятно, что высокая межгодовая изменчивость фотосинтеза в литоральной зоне имеет закономерный характер вследствие неустойчивости водной среды.

### **Особенности сезонного цикла первичной продукции в литорали и пелагиали Онежского озера**

Закономерности сезонного цикла первичной продукции в глубоководном районе озера довольно хорошо изучены в 1989–2006 гг. (Тимакова, Теканова, 1999; Сярки, Теканова, 2008; Теканова, Сярки, 2015). Среднегодовое значение сезонной динамики фотосинтеза в 2007–2023 гг. (рис. 2в) в целом повторяет кривую, полученную для пелагиали ранее.

Основным различием в пелагическом и литоральном сезонном цикле первичной продукции является наличие в последнем весеннего максимума фотосинтеза (рис. 2а, б). Весной в пелагиали, как и в литорали, в условиях гомотермии при температуре около +4...+6°C (конец мая – начало июня) проходит сезонный максимум развития фитопланктона, который также обеспечивается главным образом холодноводной *A. islandica* (Петрова, 1990; Теканова, Сярки, 2015). Холодноводный диатомовый планктон поднимается из глубинных слоев воды в результате конвективного перемешивания (Петрова, 1990) и привносится по мере прохождения термобара из районов с температурой воды больше +4°C (Петрова, 1990; Suarez *et al.*, 2019). Среднегодовое значение биомассы фитопланктона в период весеннего максимума в пелагиали 0.8 мг/л (Теканова, Сярки, 2015) сопоставимо с показателями в литорали – 0.8 (2013 г.) и 1.0 (2014 г.) мг/л (Чекрыжева, Калинин, 2016). При одинаковых уровнях развития фитопланктона и температуре воды наличие весеннего максимума фотосинтеза в литорали может объясняться лучшими световыми условиями. Фотический слой в Онежском озере достигает глубины двойной прозрачности воды (Тимакова, Теканова, 1999), и в литорали при прозрачности воды 3 м он мог бы составлять в среднем 6 м (табл. 1). Таким образом, при глубине в месте исследований 3 м фотический слой ограничен глубиной одной прозрачности воды, то есть литоральный диатомовый планктон находится в верхней части фотического слоя. Немаловажным фактором формирования весеннего пика

фотосинтеза в литорали может быть и повышенное содержание фосфора в воде. Весной в прибрежной теплоактивной зоне концентрации общего фосфора могут достигать 18–24 мкг/л (Сабылина, 1999; Сабылина, Рыжаков, 2018), а в открытом плесе озера его содержание мало меняется по сезонам, сохраняясь в пределах 7–12 мкг/л (Сабылина, 1999; Сабылина и др., 2010; Теканова, Сярки, 2015; Zobkov *et al.*, 2022).

Осеннее повышение скорости фотосинтеза в пелагиали, как и в литорали, наблюдается не всегда. Оно происходит в сентябре или октябре и не достигает больших значений (Тимакова, Теканова, 1999). Поэтому при построении среднегодового хода сезонной динамики фотосинтеза в этом районе озера осенний подъем фотосинтеза сглаживается (рис. 2в).

Величины сезонных максимумов фотосинтеза в литорали в средневодном 2013 г. (60.0–85.0 мкг С/л·сут) были ниже среднегодового максимума в пелагиали 113.0 мкг С/л·сут, в маловодном 2014 г. (101.0–135.0 мкг С/л·сут) они были сопоставимы (рис. 2).

Средняя за вегетационный период скорость фотосинтеза в поверхностном слое воды литорали достоверно отличалась от этой величины в пелагиали (табл. 1). В средневодном 2013 г. она выходила за нижнюю границу доверительного интервала для медианы в глубоководном районе, в маловодном 2014 г. – значительно превышала верхнюю границу из-за наличия большого осеннего максимума фотосинтеза. Средняя за вегетационный период первичная продукция под м<sup>2</sup> в 2013 г. также выходила за нижнюю границу доверительного интервала для медианы в глубоководном районе (табл. 1), а в 2014 г. – находилась в его пределах. Несмотря на достоверно более высокую скорость фотосинтеза в поверхностном слое воды литорали в 2014 г. по сравнению с глубоководным районом, первичная продукция под м<sup>2</sup> ограничивалась глубиной. Учитывая выявленную высокую межгодовую изменчивость литоральной первичной продукции, на основании двухлетних измерений сложно сделать однозначный вывод о том, более или менее активно протекает первично-продукционный процесс в литорали по сравнению с глубоководным районом озера. На данном этапе результаты анализа статистических характеристик фотосинтеза могут свидетельствовать лишь о том, что средняя за вегетационный период двух лет скорость фотосинтеза в поверхностном слое воды в условно “чистой” литорали озера достоверно не отличалась от пелагической (табл. 1). В то же время средняя за период исследований первичная продукция под м<sup>2</sup> в литорали была значимо ниже, чем в пелагиали (табл. 1), из-за малой глубины, ограничивающей фотический слой.

### Роль литоральной зоны в первичной продуктивности Онежского озера

Площадь литоральной зоны составляет 924.5 км<sup>2</sup>, или 9.5 % всей площади озера (9692 км<sup>2</sup> без островов). Для расчета продукции фитопланктона с этой площади было принято, что во всей литоральной зоне озера создается такое же количество органического углерода ( $C_{\text{орг}}$ ), как в изученной каменисто-песчаной литорали, которая составляет 70% всей литоральной зоны. Кроме того, из-за отсутствия данных не учитывали возможно более высокую первичную продукцию в литорали двух эвтрофируемых губ – Кондопожской и Петрозаводской, которые составляют лишь 4% площади озера. Исходя из годовой первичной продукции под м<sup>2</sup> в литорали (табл. 1), во всей литоральной зоне в средней по водности год фитопланктоном создается 8.6 тыс. т  $C_{\text{орг}}$ , в маловодный – 18.9, в среднем – 13.7 тыс. т. Исходя из среднемноголетней годовой первичной продукции под м<sup>2</sup> в пелагиали (табл. 1), на акватории Онежского озера (за исключением литорали), фитопланктон за год продуцирует 197.3 тыс. т  $C_{\text{орг}}$ . Таким образом, среднемноголетняя продукция фитопланктона со всей площади Онежского озера составляет 211 тыс. т  $C_{\text{орг}}$ , при этом вклад в нее литорального фитопланктона не превышает 6.5%.

Современные сведения о продукции высшей водной растительности и фитоперифитона в литорали Онежского озера отсутствуют. По данным И.М. Распопова (1985), высшая водная растительность в Онежском озере развита слабо, ее годовая продукция составляет около 2.8 тыс. т  $C_{\text{орг}}$ . В продуцировании органического вещества фитоперифитоном ведущая роль принадлежит обрастаниям камней. Общая продукция фитообрастаний камней и макрофитов на период начала 1970-х гг. оценивалась в среднем в 7.7 тыс. т  $C_{\text{орг}}$  (Рычкова, 1979), то есть приблизительно в 2 раза меньше, чем продукция литорального фитопланктона. В целом, годовая продуктивность литоральной зоны с учетом всех первичных продуцентов может достигать в среднем около 21.4 тыс. т  $C_{\text{орг}}$ , а ее доля в первичной продуктивности Онежского озера возрастает до 10%.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение фотосинтеза фитопланктона на преобладающей в Онежском озере каменисто-песчаной литорали в 2013 и 2014 гг. показало, что его сезонная динамика характеризовалась двумя или тремя максимумами. Величины фотосинтеза в это время достигали 60.0–135.0 мкг С/л·сут и не выходили за пределы, установленные для олиготрофных экосистем. Весенний подъем в мае

отмечался при температуре воды ниже 8°C, концентрациях общего фосфора 18–20 мкг/л и обеспечивался холодноводной диатомеей *Aulacoseira islandica*. Летний максимум фотосинтеза отмечался в июне или июле при максимальных температурах воды 18–22°C, низких концентрациях общего фосфора 7–14 мкг/л. На фоне доминирования летних диатомей вклад в первичную продукцию летом вносили высокопродуктивные зеленые и эвгленовые водоросли. Осенний подъем наблюдался в октябре 2014 г. при температуре воды 8°C и концентрации общего фосфора 7 мкг/л. Основными продуцентами осенью были диатомеи и цианобактерии.

Сезонная динамика фотосинтеза в литорали характеризовалась наличием весеннего максимума, которого нет в пелагиали. При одинаковых температурах воды, уровне и составе фитопланктона с доминированием *A. islandica* развитие весеннего пика фотосинтеза в литоральной зоне определяется, вероятно, лучшими световыми условиями и обеспеченностью фосфором. Средние и максимальные величины фотосинтеза за вегетационный период значительно не превышали соответствующие показатели в глубоководном районе озера.

Вклад продукции литорального фитопланктона в первичную продукцию всего Онежского озера оказался очень мал – в среднем 6.5%. С учетом продукции фитоперифитона и высшей водной растительности роль литоральной зоны в продуктивности водоема увеличивалась незначительно, до 10%.

Новые данные о закономерностях первичной продукции в литорали позволяют включить эту зону в систему биомониторинга Онежского озера, которая ранее охватывала только глубоководную часть акватории.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность А.В. Рябинкину и М.В. Калмыкову за помощь в организации двухлетних экспедиционных работ.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института водных проблем Севера Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр РАН”

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

## БИОЭТИКА

Автор утверждает, что эта работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бехтерева Г.В., Кравченкова Т.Г.* Климатические особенности года // Государственный доклад о состоянии окружающей среды в Республике Карелия в 2014 году. Петрозаводск: ООО “Версо”, 2015. С. 10–13.
- Бондаренко Н.А., Русанов И.И., Черницына С.М., Шубенкова О.В., Захаренко А.С., Погодаева Т.В., Пименов Н.В., Земская Т.И.* Структура и продукционный потенциал летнего фитопланктона озера Байкал в современный период // Водн. рес. 2022. Т. 49. №1. С. 66–76.  
DOI: 10.31857/S0321059622010059
- Бондаренко Н.А., Русанов И.И., Черницына С.М., Шубенкова О.В., Пименов Н.В., Земская Т.И.* Функционирование микроводорослей подледного планктона и ледовой интерстициали в прибрежной зоне озера Байкал // Микробиология. 2020. Т. 89. № 3. С. 344–355.  
DOI: 10.31857/S0026365620030064
- Бульон В.В.* Радиоуглеродный метод определения первичной продукции фитопланктона, его возможности и ограничения в сравнении с кислородным // Методические вопросы изучения первичной продукции планктона внутренних водоемов. СПб: Гидрометеозидат, 1993. С. 147–157.
- Бульон В.В.* Первичная продукция планктона внутренних водоемов. Л.: Наука, 1983. 150 с.
- Диагноз и прогноз термогидродинамики и экосистем великих озер России. Петрозаводск: Карельск. науч. центр РАН, 2020. 255 с.
- Калинкина Н., Полякова Т., Сярки М., Теканова Е.* Научные основы биомониторинга Онежского озера // Докл. Академии наук. 2018а. Т. 482. № 1. С. 92–95.
- Калинкина Н.М., Теканова Е.В., Сабылина А.В., Рыжаков А.В.* Изменения гидрохимического режима Онежского озера с начала 1990-х годов // Изв. РАН. Сер. географ. 2019. № 1. С. 62–72.  
DOI: 10.31857/S2587-55662019162-72.
- Калинкина Н.М., Филатов Н.Н., Теканова Е.В., Балаганский А.Ф.* Многолетняя динамика стока железа и фосфора в Онежское озеро с водами р. Шуя в условиях климатических изменений // Региональная экология. 2018б. Т. 52. № 2. С. 65–73.  
DOI: 10.30694/1026-5600-2018-2-65-73.
- Кравченкова Т.Г., Бехтерева Г.В.* Климатические особенности года // Государственный доклад о состоянии окружающей среды в Республике Карелия в 2013 году. Петрозаводск: ООО “Версо”, 2014. С. 12–18.
- Кузнецов С.И., Дубинина Г.А.* Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989. 288 с.
- Мартынова М.В.* Донные отложения как составляющая лимнических экосистем. М: Наука, 2010. 243 с.
- Онежское озеро: Атлас. Петрозаводск: Карельск. науч. центр РАН, 2010. 151 с.
- Петрова Н.А.* Сукцессии фитопланктона при антропогенном эвтрофировании больших озер. Л.: Наука, 1990. 187 с.
- Распопов И.И.* Высшая водная растительность больших озер Северо-запада СССР. Л.: Наука, 1985. 197 с.
- Распопов И.И.* Высшая водная растительность литоральной зоны Онежского озера // Литоральная зона Онежского озера. Л.: Наука, 1975. С. 103–122.
- Ривьер И.К., Гусаков В.А., Жгарева Н.Н., Перова С.Н., Столбунова В.Н., Щербина Г.Х.* Изменения структурно-функциональных характеристик биологических сообществ. Уровневый режим // Экологические проблемы Верхней Волги. Ярославль: Изд-во ЯГТУ, 2001. С. 282–283.
- Рычкова М.А.* Перифитон литоральной зоны Онежского озера // Литоральная зона Онежского озера. Л.: Наука, 1975. С. 123–137.
- Рычкова М.А.* Перифитон Онежского озера // Гидробиол. ж. 1979. Т. 15. № 3. С. 13–18.
- Сабылина А.В.* Современный гидрохимический режим озера // Онежское озеро, экологические проблемы. Петрозаводск: Карельск. науч. центр РАН, 1999. С. 58–108.
- Сабылина А.В., Лозовик П.А., Зобков М.Б.* Химический состав воды Онежского озера и его притоков // Водн. рес. 2010. Т. 37. № 6. С. 717–729.
- Сабылина А.В., Рыжаков А.В.* Гидрохимическая характеристика литоральной зоны Онежского озера // Водн. рес. 2018. Т. 45. № 2. С. 179–187.  
DOI: 10.7868/S0321059618020074
- Сярки М.Т.* Изучение траекторий сезонной динамики планктона с помощью метода двойного сглаживания // Принципы экологии. 2013. № 1. С. 62–68.  
DOI: 10.15393/j1.art.2013.2141
- Сярки М.Т., Теканова Е.В.* Сезонный цикл первичной продукции в Онежском озере // Изв. РАН. Сер. биол. 2008. № 5. С. 621–625.
- Теканова Е.В., Сярки М.Т.* Особенности фенологии первично-продукционного процесса в пелагиали Онежского озера // Изв. РАН. Сер. биол. 2015. № 6. С. 645–652.  
DOI: 10.7868/S0002332915060119
- Тимакова Т.М., Теканова Е.В.* Характеристика процессов первичного продуцирования органического вещества // Онежское озеро. Экологические проблемы. Петрозаводск: Карельск. науч. центр РАН, 1999. С. 158–174.
- Чекрыжева Т.А., Калинкина Н.М.* Структура и сезонная динамика фитопланктонных сообществ в открытой и закрытой литорали Онежского озера

- (Пиньгуба, Пухтинская бухта) // Тр. Карельск. научн. центра РАН. № 12. 2016. С. 83–95.  
DOI: 10.17076/eco363
- Чекрыжева Т.А., Калинкина Н.М. Структура и сезонная динамика фитопланктонных сообществ в открытой и закрытой литорали Онежского озера (Пиньгуба, Пухтинская бухта) // Тр. Карельск. науч. центра РАН. 2016. № 12. С. 83–95.  
DOI: 10.17076/eco363
- Auer M.T., Gatzke T.L. The Spring Runoff Event, Thermal Bar Formation, and Cross Margin Transport in Lake Superior // J. of Great Lakes Res. 2004. Vol. 30. Suppl. 1. P. 64–81.  
[https://doi.org/10.1016/S0380-1330\(04\)70378-0](https://doi.org/10.1016/S0380-1330(04)70378-0)
- Bartels P., Hirsch P.E., Svanback R., Eklov P. Dissolved organic carbon reduces habitat coupling by top predators in lake ecosystems // Ecosystems. 2016. V. 19. P. 955–967.  
<https://doi.org/10.1007/s10021-016-9978-x>
- Brothers S., Köhler J., Attermeyer K., Grossart H.P., Mehner T., Meyer N., Scharnweber K., Hilt S. A feedback loop links brownification and anoxia in a temperate, shallow lake // Limnol. Oceanogr. 2014. V. 59. № 4. P. 1388–1398.  
<https://doi.org/10.4319/lo.2014.59.4.1388>
- Cotner J.B., Kenning J., Scott J.T. The microbial role in littoral zone biogeochemical processes: Why Wetzel was right // Verh. Internat. Verein. Limnol. 2009. V. 30. Part 6. P. 981–984.
- Efremova T., Palshin N., Zdorovenov R. Long-term characteristics of ice phenology in Karelian lakes // Estonian Journal of Earth Sciences. 2013. V. 62. № 1. P. 33–41.  
DOI: 10.3176/earth.2013.04
- Fahnenstiel G.L., Sayers M.J., Shuchman R.A., Yousef F., Pothoven S.A. Lake-wide phytoplankton production and abundance in the Upper Great Lakes: 2010–2013 // J. of Great Lakes Res. 2016. V. 42. Iss. 3. P. 619–629.  
<https://doi.org/10.1016/j.jglr.2016.02.004>
- Kalinkina N., Tekanova E., Korosov A., Zobkov M., Ryzhakov A. What is the extent of water brownification in Lake Onego, Russia // J. of Great Lakes Res. 2020. V. 46. Iss. 4. P. 850–861.  
DOI: 10.1016/j.jglr.2020.02.008
- Ladoga and Onego – Great European Lakes. Observation and Modelling. Chichester: Springer-Praxis. 2010. 302 p.
- Padisák J., Scheffler W., Sipos C., Kasprzak P., Koschel R., Krienitz I. Spatial and temporal pattern of development and decline of the spring diatom populations in Lake Stechlin in 1999 // Arch. Hydrobiol. 2003. V. 58. P. 135–155. <http://real.mtak.hu/id/eprint/3310>
- Raspopov I.M., Andronikova I.N., Dotsenko O.N., Kurashov E.A., Letanskaya G.I., Panov V.E., Rychkova M.A., Telesh I.V., Tchernykh O.A., Vorontsov F.F. Littoral zone of Lake Ladoga: ecological state evaluation // Hydrobiologia. 1996. V. 322: P. 39–47.  
<https://doi.org/10.1007/BF00031803>
- Sarkkola S., Nieminen M., Koivusalo H., Laurén A., Kortelainen P., Mattsson T., Palviainen M., Piirainen S., Starr M., Finér L. Iron concentrations are increasing in surface waters from forested headwater catchments in eastern Finland // Science of the Total Environment. 2013. V. 463–464. P. 683–689.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.072>
- Suarez E.L., Tiffay M.-C., Kalinkina N., Tchekryzheva T., Sharov A., Tekanova E., Syarki M., Zdorovenov R.E., Makarova E., Mantzouki E., Venail P., Ibelings B.W. Diurnal variation in the convection-driven vertical distribution of phytoplankton under ice and after ice-off in large Lake Onego (Russia) // Inland Waters. 2019. V. 9. № 2. P. 193–204.
- Urban N.R., Auer M.T., Green S.A., Lu X., Apul D.S., Powell K.D., Bub L. Carbon cycling in Lake Superior // Journal of geophysical research. 2005. V. 110. C06S90.  
<https://doi.org/10.1029/2003JC002230>
- Vollenweider R.A., Munavar M., Stadelmann P.A. Comparative review of phytoplankton and primary production in the Laurentian Great Lakes // J. Fish. Res. Board Canada. 1974. V. 31. № 5. P. 739–762.  
<https://doi.org/10.1139/f74-100>
- Wetzel R.G. Limnology: Lake and river ecosystems. London: Academic Press. 2001. 3rd ed. 850 p.
- Wetzel R.G. Microcommunities and microgradients: linking nutrient regeneration, microbial mutualism, and high sustained aquatic primary production // Neth. J. Aquat. Ecol. 1993. V. 27. P. 3–9.  
<https://doi.org/10.1007/BF02336924>
- Woolway R.I., Merchant C.J. Intralake heterogeneity of thermal responses to climate change: A study of large Northern Hemisphere lakes // J. Geoph. Res.: Atmospheres. 2018. V. 123. P. 3087–3098.  
<https://doi.org/10.1002/2017JD027661>
- Yurista P.M., Kelly J.R., Scharold J.V. Great Lakes near-shore-offshore: Distinct water quality regions // J. of Great Lakes Res. 2016. V. 42. Iss. 2. P. 375–385.  
<https://doi.org/10.1016/j.jglr.2015.12.002>
- Zobkov M., Zobkova M., Galakhina N., Efremova T., Efremenko N., Kulik N. Data on the chemical composition of Lake Onego water in 2019–2021 // Data in Brief. 2022. V. 42. P. 108079.  
DOI: 10.1016/j.dib.2022.108079

## **Primary production in the littoral zone of Lake Onego and its contribution to the productivity of the reservoir**

**E. V. Tekanova<sup>#</sup>**

*Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences  
Northern Water Problems Institute, ave. A. Nevsky, 50, Petrozavodsk, 185000 Russia  
<sup>#</sup>e-mail: etekanova@mail.ru*

For the first time, two-year seasonal studies of phytoplankton production were carried out in the rocky-sandy littoral zone of the northern deep and cold-water Lake Onego. The research results showed that photosynthesis is characterized by two or three seasonal maxima, the values of which are within the limits of oligotrophic ecosystems. The main primary producers, the concentration of phosphorus in water, and water temperature during the growing season are considered. Differences in the seasonal dynamics of photosynthesis and a similar level of seasonal average and maximum values were revealed in comparison with the deep-water region of the lake. The small contribution of littoral phytoplankton production to the primary productivity of the ecosystem is shown.

*Keywords:* Lake Onego, littoral zone, pelagic zone, photosynthesis, phytoplankton, seasonal dynamics

УДК 582.24:574.9

## ПРИГОДНОСТЬ МЕСТООБИТАНИЙ И ДИНАМИКА АРЕАЛА РЕДКИХ ПУСТЫННЫХ ВИДОВ МИКСОМИЦЕТОВ РОДА *DIDYMIUM* В УСЛОВИЯХ ГЛОБАЛЬНОГО ИЗМЕНЕНИЯ КЛИМАТА В АЗИИ

© 2024 г. А. В. Власенко<sup>®</sup>, В. А. Власенко<sup>®</sup>

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, ул. Золотодолинская, 101, Новосибирск, 630090 Россия  
<sup>®</sup>E-mail: vlasenkomyces@mail.ru; anastasiyamix81@mail.ru

Поступила в редакцию 02.06.2023 г.

После доработки 22.05.2024 г.

Принята к публикации 22.05.2024 г.

Способность определить пространственное распределение редких видов имеет решающее значение для понимания факторов окружающей среды, влияющих на них. Моделирование пространственного распределения методом максимальной энтропии (MaxEnt) решает эту проблему, позволяя сделать выводы о распределении видов при изменении окружающей среды на основе данных о встречаемости. С помощью этого метода мы построили карту современного и потенциального географического распространения двух редких видов аридных миксомицетов – *Didymium mexicanum* и *Didymium nullifilum*. Были созданы модели потенциального распространения видов в мировом масштабе с использованием биоклиматических данных и программного обеспечения MaxEnt для моделирования пригодности местообитаний видов в текущих условиях (~1950–2000 гг.) и при прогнозируемых изменениях будущего климата (2100 г. н.э.) на основе 18 точек пространственного распространения *D. mexicanum* и 4 точек для *D. nullifilum*. Для видов дано подробное морфологическое описание. Вид *D. mexicanum* выявлен нами впервые в Азии.

**Ключевые слова:** моделирование распространения видов, редкие виды, *Didymium mexicanum*, *Didymium nullifilum*

**DOI:** 10.31857/S1026347024060122, **EDN:** ukbzth

Распространение растений, грибов, простейших и видов других организмов претерпевает быстрые изменения в связи с модификацией среды обитания и изменением климата. Это вызывает озабоченность по поводу сохранения редких и исчезающих видов и поднимает экологические вопросы о процессах, которые управляют ареалами и нишами. Модели потенциального распределения, которые сопоставляют данные о видах с абиотическими переменными окружающей среды, стали общепризнанным инструментом в экологии и охране природы (Segurado, Araújo, 2004; Guisan, Thuiller 2005; Chapman, Purse, 2011).

Модели распространения видов (SDM) составляют наиболее распространенный класс моделей в экологии и сохранении биоразнообразия. Новые пакеты программного обеспечения и растущая доступность цифровых ГИС значительно облегчили использование SDM (Zurell *et al.*, 2020). SDM представляют собой эмпирические модели, связывающие полевые наблюдения с переменными-предикторами окружающей среды на основе статистически или теоретически полученных поверхностей отклика (Guisan, Zimmermann, 2000).

MaxEnt – один из наиболее часто используемых методов для определения распределения видов и экологических допусков на основе данных о встречаемости (Phillips, Dudík, 2008). MaxEnt использует принцип максимальной энтропии, основанный на данных только о присутствии, для оценки набора функций, которые связывают переменные окружающей среды и пригодность среды обитания для аппроксимации видовой ниши и потенциального географического распространения (Phillips *et al.*, 2006). Моделирование MaxEnt в последнее время стало активно использоваться для грибов. Например, он используется для определения пространственного распределения экономически значимых видов грибов, чтобы понять факторы окружающей среды, которые на них влияют, а также в случае редких видов для понимания процессов управления, необходимых для их сохранения (Yuan *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2017; Pietras *et al.*, 2018).

Моделирование географического распространения миксомицетов проведено с помощью MaxEnt и Wordclim для темнеспорового нивального вида *Physarum albescens* и светлоспоровых миксомицетов *Arcyria cinerea*, *Perichaena depressa*, *Hemitrichia*

*serpula* на Филиппинском архипелаге, а также для космополитных видов *Diderma hemisphaericum* и некоторых других миксомицетов (Aguilar, Lado, 2012; Almadrones-Reyes, Dagamac, 2018; Limbo-Dizon *et al.*, 2022).

Большинство находок *Didymium mexicanum* происходит из Северной Америки (Мексика, США), известны также находки из Южной Америки (Аргентина). В Евразии вид встречается в засушливых районах, прилегающих к Каспийскому морю (Россия, Казахстан). В целом, в мировом масштабе известно около 100 находок вида, но если исключить повторы, то вид обнаружен только в 18 локалитетах. В 2020 г. *D. mexicanum* был идентифицирован нами в степной зоне Алтайского края, Россия. Это первая находка вида в Азии.

Для вида *Didymium nullifilum* ранее было известно пять находок из типового местонахождения в Йеллоустонском национальном парке, штат Вайоминг, Северная Америка. Всего в мире известно восемь находок из четырех местонахождений, в том числе три наши находки из трех местонахождений в Сибири (Vlasenko *et al.*, 2017; Czernyadjeva *et al.*, 2019).

Первоначально считалось, что *D. mexicanum* и *D. nullifilum* являются эндемиками районов, из которых они были описаны как новые для науки. Новые находки видов из Евразии изменили отношение к видам как к эндемикам. Остается открытым вопрос, всегда ли эти виды обитали в Евразии, или они расширили свою нишу и освоили новые места обитания в Евразии из-за изменения климата и глобального потепления. Не исключено, что *D. mexicanum* и *D. nullifilum* из-за малого размера спорофоров и особенности субстратной специализации могут остаться незамеченными при культивировании во влажных камерах. Скорее всего, эти виды не ограничены в распространении типовыми местонахождениями. Но тем не менее в связи с изменением климата и глобальным потеплением границы их ареалов могут подвергаться локальным изменениям.

Для решения этих вопросов и установления географических закономерностей распространения изучаемых видов в Евразии на основе объективных данных было проведено моделирование их потенциального распространения с использованием биоклиматических данных (Bioclim) и программы MaxEnt для моделирования пригодности среды обитания видов в условиях современного климата (~1950 г. –2000 г. н.э.) и в условиях климата будущего (2100 г. н.э.). Для видов также дано подробное морфологическое описание.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

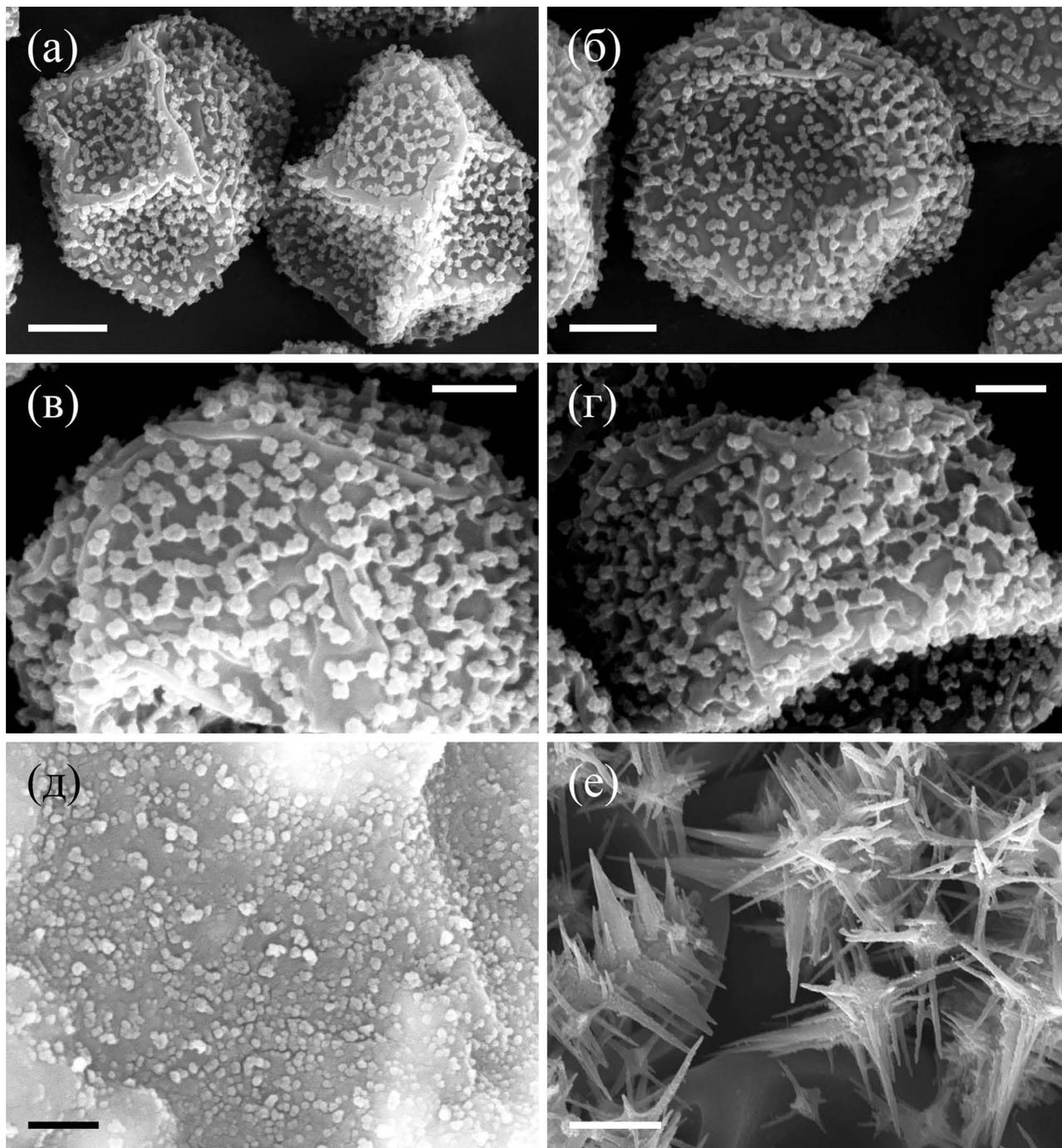
Объекты исследования – два редких вида миксомицетов *D. mexicanum* (рис. 1, 2 а, б) и *D. nullifilum* (рис. 2 в–д).

В данное исследование включены образцы *D. mexicanum*, собранные в ходе наших экспедиций в Алтайский край в 2020 г. Местонахождения *D. nullifilum* получены из наших предыдущих статей (Vlasenko *et al.*, 2017; Czernyadjeva *et al.*, 2019). Ваучерные экземпляры изученных видов хранятся в Гербарии им. М.Г. Попова (НСК), Новосибирск, Россия.

Для морфологического анализа использовали стереомикроскоп Carl Zeiss Stemi DV4 и световой микроскоп Carl Zeiss AxioLab. Микроскопическое исследование на свежих препаратах проведено в поливиниллактофеноле. Детальное изучение морфологических особенностей проводили на сканирующем электронном микроскопе Carl Zeiss EVO MA 10. Для этого образцы сушили на воздухе, фиксировали на алюминиевых столиках двусторонней липкой пленкой и проводили напыление золотом.

Были использованы записи, поддерживаемые только конкретными географическими координатами. Всего мы включили 18 местонахождений *D. mexicanum* (18.3019° N, –97.2155° E; 23.3591° N, –65.345° E; 25.62° N, –102.88° E; 25.72° N, –103.64° E; 25.89° N, –103.65° E; 26.2° N, –103.1° E; 26.56° N, –103.96° E; 26.81° N, –103.24° E; 29.5413° N, –104.7143° E; 35.886° N, –112.1166° E; 36.4576° N, –105.635° E; 46.386° N, 47.116° E; 46.4754° N, 49.2351° E; 47.5681° N, 47.1629° E; 48.1381° N, 46.832° E; 49.1558° N, 46.5555° E; 49.3885° N, 46.789° E; 53.2628° N, 80.6799° E) и 4 местонахождения *D. nullifilum* (44.7667° N, –110.2333° E; 50.5033° N, 115.1497° E; 50.9708° N, 106.3761° E; 56.6541° N, 124.755° E).

Для картографирования и анализа географических данных (<https://www.diva-gis.org/>) использовали компьютерную программу DIVA-GIS (Hijmans *et al.*, 2012). Для получения данных о рельефе и высотах изучаемых мест, а также глобальных данных о текущем (~1950–2000 лет) и будущем (климатические условия 2xCO<sub>2</sub>, модель CCM3, 2100 г. н.э.) климате (<https://www.diva-gis.org/Data> и <https://www.diva-gis.org/climate>) использовали Worldclim, версия 1.3. Были использованы данные для визуализации о глобальных границах стран WGS 84 ([https://hub.arcgis.com/datasets/a21fdb46d23e4ef896f31475217cbb08\\_1/data?geometry=-99.844%2C-89.998%2C99.844%2C-79.394](https://hub.arcgis.com/datasets/a21fdb46d23e4ef896f31475217cbb08_1/data?geometry=-99.844%2C-89.998%2C99.844%2C-79.394)). Все 19 экологических слоев Bioclim (BIO1–BIO19) созданы с использованием DIVA-GIS с разрешением 2.5 минуты, в мировом масштабе (Hijmans *et al.*, 2005). Данные о наземных экорегионах мира (Olson *et al.*, 2001) получены из интернет-источников (<https://www.worldwildlife.org/publications/terrestrial-ecoregions-of-the-world> и <https://www.arcgis.com/apps/View/index.html?appid=d60ec415febb4874ac5e0960a6a2e448>). Границы биомов уточнены с использованием интернет-

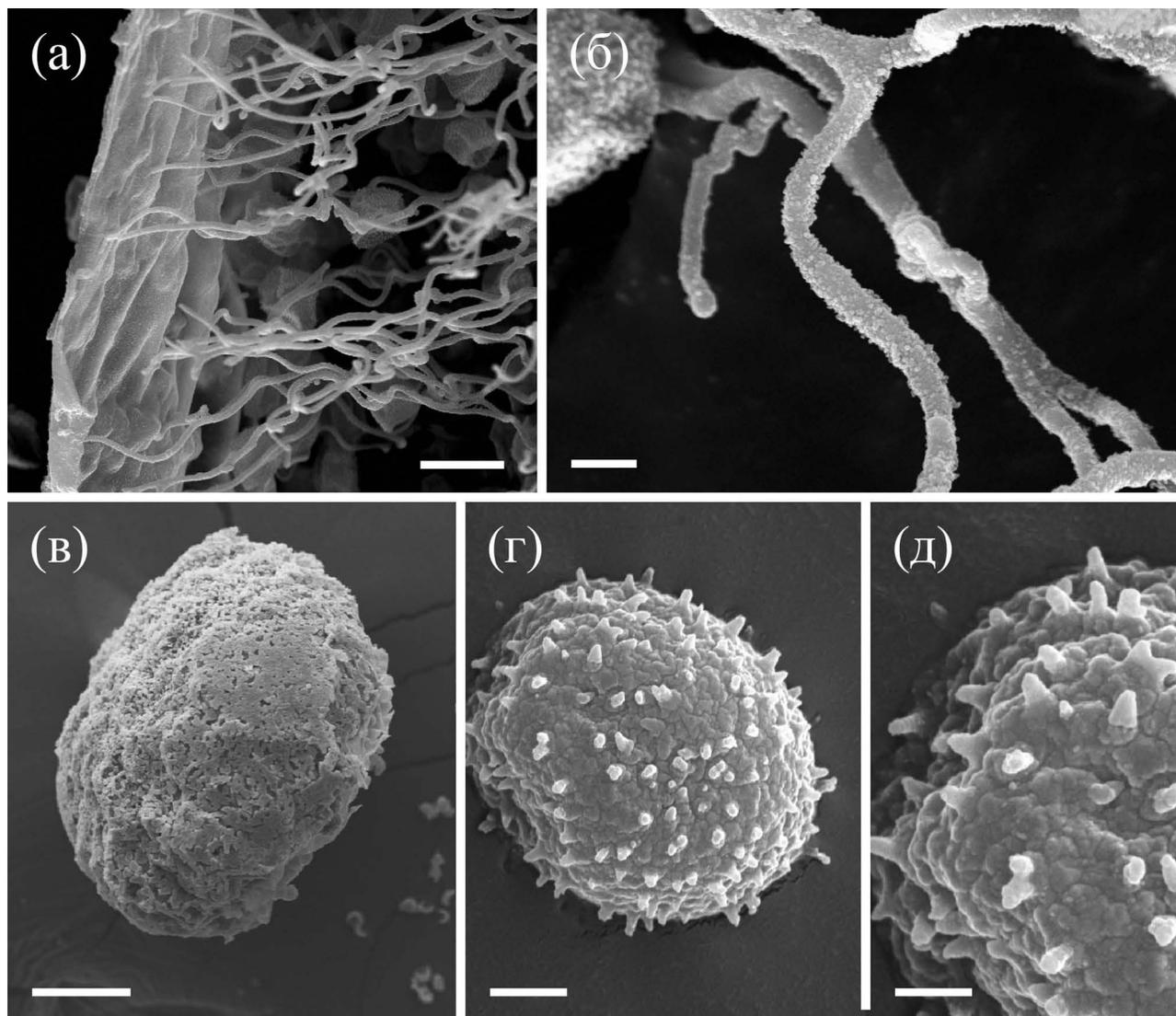


**Рис. 1.** *Didymium mexicanum* (NSK 1016359): а, б – споры; в, г – поверхность спор; д – орнамент внутренней стороны перидия; е – кристаллы извести на поверхности перидия. Масштаб: а, б – 2 мкм, в–д – 1 мкм, е – 4 мкм.

источника <https://www.arcgis.com/apps/View/index.html?appid=d60ec415febb4874ac5e0960aba2e448>.

Для моделирования пригодности местообитаний видов использовали программу MaxEnt (Phillips, Dudík, 2008). Модель пространственного распределения *Didymium mexicanum* и *D. nullifilum* с использованием метода максимальной энтропии (MaxEnt)

на основе набора данных из 22 записей о встречаемости. Мы использовали программы DIVA-GIS и MaxEnt в соответствии с рекомендациями из руководства по пространственному анализу разнообразия и распространения растений (Scheldeman, Zonneveld, 2010). Методика работы наиболее полно описана в нашей недавней публикации (Vlasenko *et al.*, 2021).



**Рис. 2.** *Didymium mexicanum* (NSK 1016359): а – нити капиллиция, прикрепляющиеся к перидию; б – нити капиллиция. *Didymium nulliflum* (NSK 1016358): в – спорокарп; г – спора; д – поверхность споры. Масштаб: а – 10 мкм, б, в – 2 мкм, г – 50 мкм, д – 1 мкм.

Модель MaxEnt для текущего и будущего климата для двух модельных видов имеет высокий уровень статистической достоверности, о чем свидетельствует показатель AUC (Area Under Receiver Operating Characteristic Curve). Для оценки модели использовалась тестовая выборка, включающая 25% всех записей о распространении. Значение AUC для тестовых данных также было высоким. Все значения AUC попадают в диапазон 0.8–0.9 и 0.9–1, что соответствует хорошей и отличной дискриминации соответственно (Scheldeman, Zonneveld, 2010). При анализе использовали 10-процентный обучающий порог присутствия, найденный в таблице порогов, сгенерированных MaxEnt. AUC, и пороговые значения для видов показаны в табл. 1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Морфологическое описание и моделирование распространения *Didymium mexicanum**

Плазмодиокарпы *D. mexicanum* (рис. 1, 2 а, б) извилистые, удлиненные, дисковидные с небольшой вдавленностью по центру, реже – сидячие спорангии или спорангии на приподнятом основании, ножка отсутствует, разбросанные или собранные в небольшие группы без налегания друг на друга. Удлиненные плазмодиокарпы – до 20 мм в длину, дисковидные – 0.2–1.5 мм в диаметре. Гипоталлус необыкновенно светлый, светло-коричневый, коричнево-фиолетовый,

**Таблица 1.** Пороговые значения, AUC и вклад биоклиматических переменных Bioclim (в %, вклад более 10%) для *Didymium mexicanum* и *Didymium nullifilum*

Вид	Текущий климат			Будущий климат		
	AUC	AUC (25%)	10-перцентильный порог обучения	AUC	AUC (25%)	10-перцентильный порог обучения
<i>Didymium mexicanum</i>	0.989	0.979	0.046	0.991	0.975	0.026
	Непосредственная оценка вклада		При перестановке	Непосредственная оценка вклада		При перестановке
	BIO2 (22.5), BIO 12 (19.7), BIO 1 (19.1), BIO 18 (11.6)		BIO 12 (62.6), BIO 8 (12.2), BIO 18 (10.3)	BIO6 (39.9), BIO 2 (21.3), BIO 7 (13.4), BIO 11 (13)		BIO 6 (70.3), BIO 2 (28)
<i>Didymium nullifilum</i>	0.924	0.887	0.118	0.915	0.880	0.119
	Непосредственная оценка вклада		При перестановке	Непосредственная оценка вклада		При перестановке
	BIO2 (32.3), BIO 16 (19.9), BIO 17 (10.4), BIO 18 (10.1)		BIO 16 (48.2), BIO 18 (15.1), BIO 12 (12.5)	BIO7 (57.3), BIO 6 (15.2), BIO 2 (12.9)		BIO 6 (43.6), BIO 2 (40.5), BIO 7 (15.9)

прозрачный, тонкий, почти незаметный, часто общий для соседних спорангиев или плазмодиокарпов. Перидий тонкий, одинарный, когда без извести – радужный, с зеленовато-коричневым оттенком, покрыт звездчатыми кристаллами извести, меньшего размера, чем споры. Расхождение нерегулярное. Колумелла отсутствует. Капиллиций обильный, нити тонкие и свободные, шириной до 1 мкм, волнистые, разветвленные, коричневые, светло-коричневые, концы нитей светлые, на нитях капиллиция коричневые шаровидные вздутия диаметром до 3 мкм. Споры в массе коричневые, в проходящем свете коричневые, шаровидные, свободные 12–15 мкм в диаметре, плотно орнаментированы бородавками. Споры в СЭМ выглядят как многоугольные за счет выраженных линий растрескивания на оболочке споры. При изучении в СЭМ поверхность споры покрыта бородавочками, соединенными в линии и незавершенную сетку. Плазмодий неизвестен.

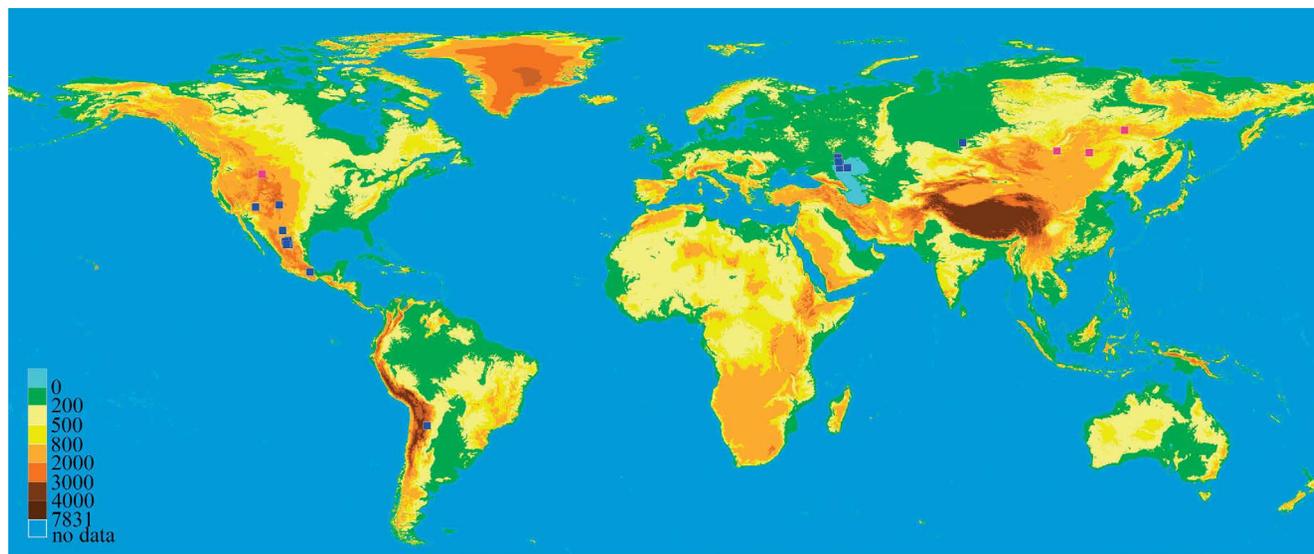
Большинство находок *D. mexicanum* в Северной Америке сделано в среднегорьях на высоте 800–2000 м над уровнем моря (рис. 3). Вид здесь тяготеет к пустынным районам, прилегающим к горным хребтам Кордильер – пустыне Чиуауа, а также к пустынным районам Гранд-Каньона и к районам к югу от Скалистых гор. Остальные 2 находки, а также одна из Южной Америки, были сделаны в высокогорьях на высоте 2000–3000 м н.у.м. Большая часть находок в Евразии, в Прикаспии, сделана на высотах до 0 м н.у.м. Наши находки вида из Алтайского края также были сделаны в низменности на высотах 0–200 м н.у.м. Находки *D. nullifilum* в Северной Америке были сделаны в высокогорьях на высоте 2000–3000 м н.у.м. Все

находки в Евразии – в Сибири, сделаны в низкогорьях на высотах 500–800 м н.у.м.

Большинство участков суши не подходят для *D. mexicanum*. Они находятся как за границей порога возможного присутствия вида в 10%, так и за порогом с вероятностью присутствия вида в 50%. Благоприятные климатические зоны вытянуты в широтном направлении и расположены как в северном, так и в южном полушариях. В Северной Америке точки присутствия вида на северной границе ареала расположены в США, в пустынных районах гор Колорадо, южнее Тисаяна (Tusayan), а также в пустынной межгорной котловине южнее Скалистых гор, в район Таос (Taos).

Вероятность присутствия вида в этих районах составляет более 50% и достигает 90% в районе Гранд-Каньона в штатах Аризона и Юта. Потенциальный ареал с 90–100% вероятностью присутствия вида находится в пустыне Чиуауа в США, в штате Нью-Мексико. Большинство выявленных точек присутствия вида в Мексике расположены южнее и восточнее гор Колорадо в среднегорных районах в пустыне Чиуауа. Вероятность присутствия вида здесь составляет от 70% до 100%. Одна точка обнаружена также в межгорной котловине в районе Сан-Себастьян Зинакатепек (San Sebastian Zinacatepec). В Южной Америке известна одна точка в Боливии, в межгорной котловине в районе Сукре (Sucre). Таким образом, пустыня Чиуауа является зоной наиболее благоприятного климата для вида.

Благоприятные климатические зоны с 50–90% вероятностью присутствия вида отмечены на юге Африки в Намибии, Ботсване и в ЮАР в пустынях Карру и Калахари, в то время как весь



**Рис. 3.** Местонахождения *Didymium mexicanum* (синие точки) и *Didymium nulliflum* (красные точки) в мировом масштабе. Цвета соответствуют высоте над уровнем моря. В легенде показана шкала высот от минимальной до максимальной в метрах над уровнем моря. Градация высот: 0–200 м – низменности, 200–500 м – возвышенности, 500–800 м – низкогорья, 800–2000 м – среднегорья, более 2000 м – высокогорья.

африканский континент, включая пустыни Намиб и Сахара, является территорией, где этот вид потенциально встречаться не может.

Зоны с относительно благоприятным климатом для вида с вероятностью присутствия 50–80% встречаются в пустынях Южной Австралии. Но, как и в Африке, здесь вид не был выявлен.

В Евразии благоприятная для вида климатическая зона с 50–90% вероятностью присутствия вида расположена в пустынных районах Каспийского моря. Здесь выявлено большинство точек присутствия вида. Небольшой участок с вероятностью присутствия вида в 50–80% расположен в районе Черного моря. Но большая часть территории с вероятностью присутствия вида в 50–80% простирается от Каспийского моря на восток, вдоль границы России и Казахстана, по полупустынным и степным районам. Самая крайняя, восточная точка, выявленная нами в степях Алтайского края, находится в зоне с вероятностью присутствия вида менее 50%.

На рис. 4, 5 представлена карта потенциального распространения *D. mexicanum*, вероятность присутствия показана цветом.

К 2100 г. ареал благоприятного климата вида существенно не изменится и его ареал не уменьшится, за исключением сокращения площади от порога возможного присутствия вида в 10% до границы с вероятностью присутствия в 50%. В некоторых пустынных районах США вероятность присутствия вида, наоборот, возрастет до 60–70%. Наиболее благоприятные местообитания сохранятся, как и прежде, в пустыне Чиуауа в Северной Америке. Район пустыни Сонора станет более благоприятным

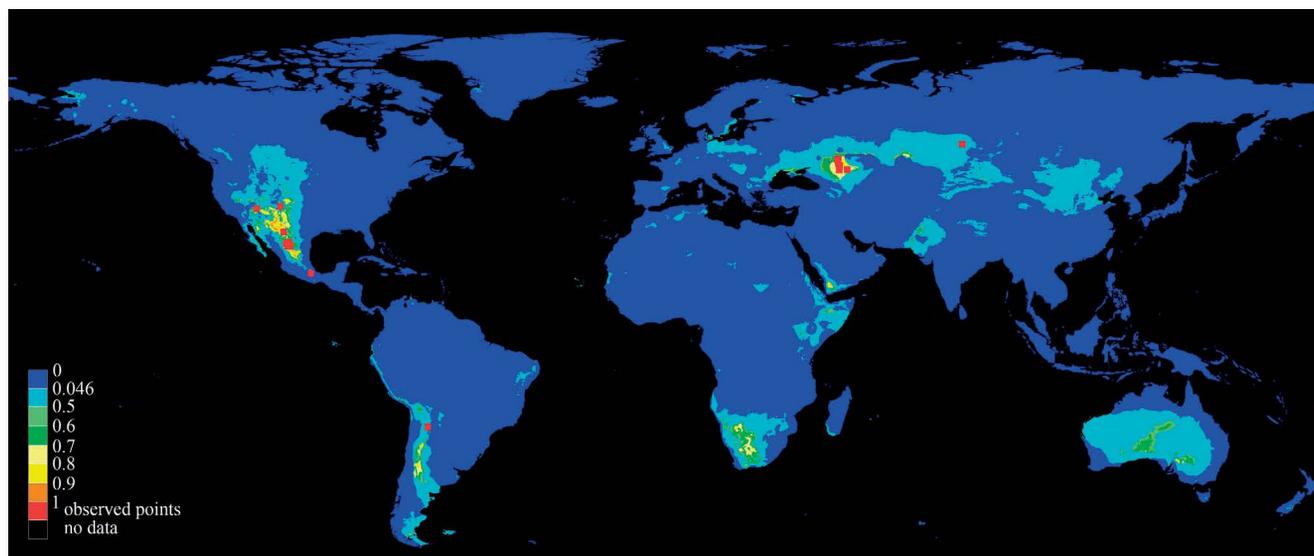
для вида, и вероятность его присутствия там увеличится до 90–100%. В Южной Америке появится достаточно большая зона благоприятного климата с вероятностью присутствия вида до 90–100% в Боливии, к северо-западу от озера Поопо (Рооро), а также в Чили, в районе природного парка Льялльайко (Llullaillaco).

На юге Африки вероятность присутствия вида также увеличится, достигая в некоторых районах 90–100%. В Австралии районы благоприятного климата для вида будут уменьшаться, и даже в южных районах вероятность присутствия вида не превысит 60%, в некоторых точках – 70%.

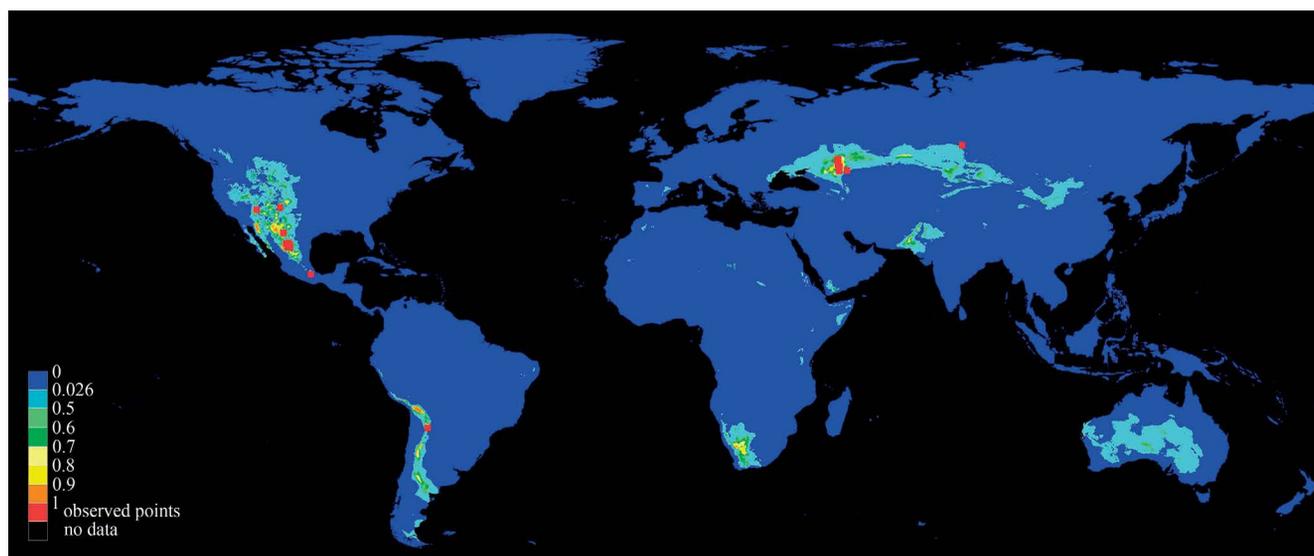
В Евразии область благоприятного климата для вида будет сокращаться на западе, и будет сосредоточена вокруг Каспийского моря. Зона к востоку от Каспия, в полупустынях и степях Казахстана, также будет благоприятной для вида, вероятность его присутствия здесь в 70–80% не увеличится, но расширится площадь самой зоны.

Самая крайняя, восточная точка, выявленная нами в степях Алтайского края, будет располагаться в зоне с вероятностью присутствия вида ниже порогового значения присутствия.

Анализ распространения *D. mexicanum* в России, в границах наземных экорегионов (рис. 6), показывает, что в районе Каспийского моря вид ассоциирован с экорегионом Понтийская степь с вероятностью присутствия здесь в 50–90%, Казахская степь (части биома Умеренные луга, саванны и кустарники) с вероятностью присутствия вида 50–60% и Прикаспийская низменная пустыня (часть биома Пустыни и ксерические кустарники)



**Рис. 4.** Потенциальное географическое распространение *Didymium mexicanum* в условиях современного климата (~1950–2000 лет) в глобальном масштабе. Результаты MaxEnt представлены в логистическом формате (значения в легенде от 0 до 1). 1 – наблюдаемые точки присутствия.



**Рис. 5.** Потенциальное географическое распространение *Didymium mexicanum* в условиях будущего климата (~1950–2000 лет) в глобальном масштабе. Результаты MaxEnt представлены в логистическом формате (значения в легенде от 0 до 1). 1 – наблюдаемые точки присутствия.

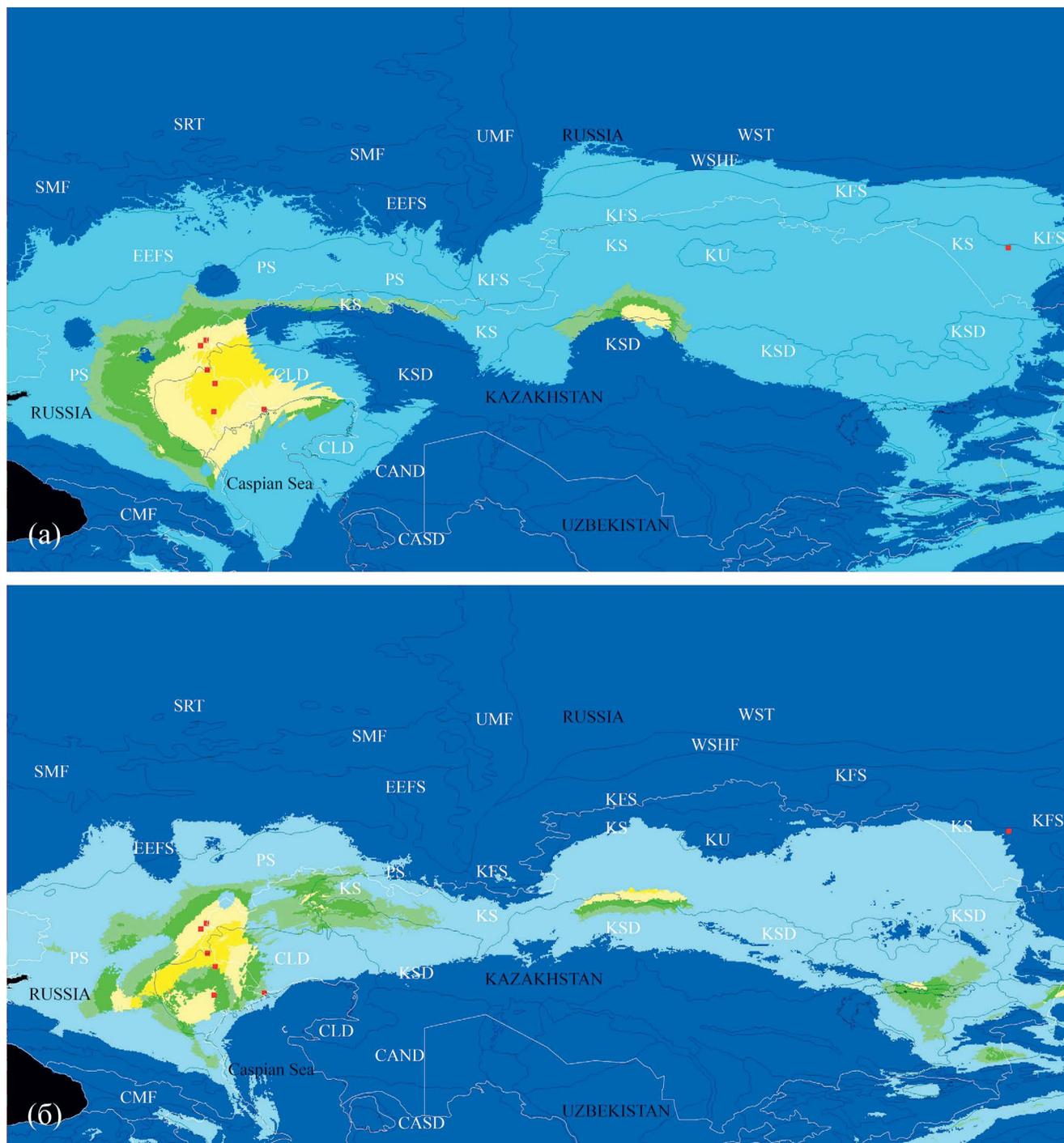
с вероятностью присутствия вида в 50–90%. Местонахождение в казахской степи выявлено нами впервые. Местонахождение *D. mexicanum* в казахской степи Алтайского края расположено на границе с казахской лесостепью в зоне с вероятностью присутствия вида менее 50%.

До 2100 года площадь благоприятного для вида климата в Прикаспийском регионе будет уменьшаться, но восточнее Каспия, в районах казахской

степи и казахских полупустынь, вероятность присутствия вида возрастет; а в местах за границей порога возможного присутствия вида в 10% приблизится к 50%, а в некоторых областях достигнет 50–80%.

На востоке зона за границей порога возможного присутствия вида в 10% сместится к югу и полностью охватит зону казахской лесостепи.

Самая крайняя, восточная точка, выявленная нами в степях Алтайского края, будет располагаться



**Рис. 6.** Потенциальное географическое распространение *Didymium mexicanum* в границах наземных экорегионов в пределах ареала вида в Азии в условиях современного и будущего климата: а – современный климат; б – будущий климат. Красные квадраты – наблюдаемые точки присутствия. Обозначения экорегионов: CLD – Прикаспийская низменная пустыня; KSD – Казахская полупустыня; CAND – северная пустыня Центральной Азии; CASD – южная пустыня Центральной Азии (части биома Пустыни и ксерические кустарники); EEFS – Восточноевропейская лесостепь; SMF – смешанные леса Кавказа; SMF – Сарматские смешанные леса; WSHF – Гемибореальные леса Западной Сибири (части биома Широколиственные и смешанные леса умеренного пояса); PS – Понтийская степь; KS – Казахская степь; KFS – Казахская лесостепь; Казахское нагорье (части биома Умеренные луга, саванны и кустарники); SRT – Скандинавская и Русская тайга; UMF – Уральские горные леса и тундра; WST – Западно-Сибирская тайга (части биома Бореальные леса/Тайга). Вероятность присутствия вида в условиях текущего и будущего климата указана аналогично рис. 4 и 5. Черная линия – границы экорегионов. Белая линия – границы стран.

в зоне с вероятностью присутствия вида ниже границы порога возможного присутствия вида в 10%. При этом южнее границы Алтайского края появится ареал в районе Казахских полупустынь и Среднеазиатских северных пустынь в районе оз. Балхаш с вероятностью присутствия вида 50–80%.

#### **Морфологическое описание и моделирование распространения *Didymium nullifilum***

Спорангии *D. nullifilum* (рис. 2 в–д) рассеянные, сидячие, расположенные на широком или суженном основании, полусферические, реже слегка удлинённые, 0.1–0.3 мм в диаметре. Гипоталлус незаметный. Перидий очень тонкий, прозрачный, покрыт плотно спрессованными и очень мелкими чешуйками извести, чаще белого или светло-серого цвета, иногда светло-бежевыми, округлыми, угловатыми до 15 мкм в диаметре. Колонка отсутствует. Капиллиций отсутствует. Споры в массе темно-коричневые, в проходящем свете фиолетово-коричневые, свободные, шаровидные, 8–10 мкм в диаметре. В проходящем свете споры выглядят неравномерно окрашенными, одна из сторон более светлая, орнаментированы колючкоподобными бородавками. При изучении в СЭМ поверхность споры покрыта бородавочками, имеющими широкое основание и острую вершину. Фанероплазмодий бесцветный. Вид хорошо культивируется в лабораторных условиях на различных питательных средах. В 2014–2025 гг. нами были проведены опыты по культивированию *D. nullifilum* методом «spore-to-spore» на голодном агаре, а также на агаре с добавлением различных

экстрактов древесных растений. Культивирование данного вида на вышеуказанных средах в лаборатории косвенно доказывает, что вид не является облигатным копробионтом.

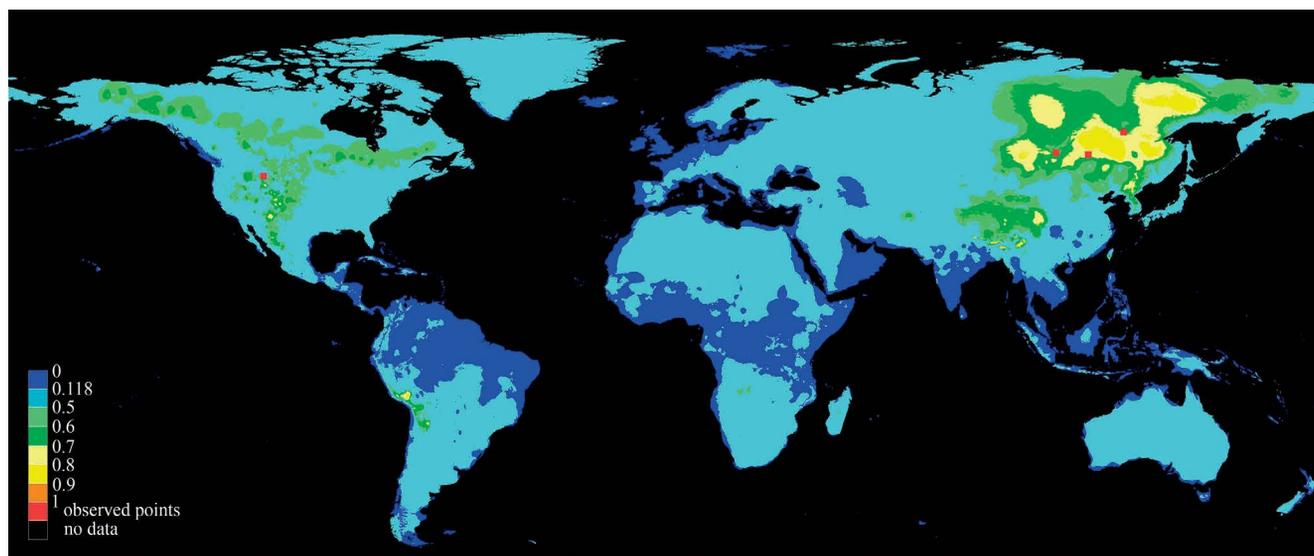
На рис. 7, 8 представлена карта потенциального распространения *D. nullifilum*, вероятность присутствия показана цветом.

Большинство территорий, как и для предыдущего вида, не пригодны для *D. nullifilum*, они находятся за границей порога присутствия вида в 50%. Зоны благоприятного климата расположены локально, но более благоприятные районы находятся в северном полушарии.

В Северной Америке вид был обнаружен только в одном типовом местонахождении в США, в Йеллоустонском национальном парке. В целом, территория Северной Америки неблагоприятна для вида. Зоны с вероятностью присутствия 50–80% разбросаны по территории США и Канады, в основном они связаны с таежной зоной, как на равнинах, так и в горных системах, где вероятность присутствия вида максимальна.

В Южной Америке вид не выявлен, но в некоторых горных районах Анд вероятность присутствия вида достигает 50–80%. Вид не был выявлен в Африке и Австралии. Большинство территорий этих континентов находится в зоне неблагоприятного для вида климата.

В Евразии благоприятная для вида климатическая зона с вероятностью присутствия вида 50–90% расположена в Восточной Сибири. Здесь выявлены все точки присутствия вида в Евразии. Небольшой ареал с 50–80% вероятностью присутствия вида расположен на Тибетском нагорье.



**Рис. 7.** Потенциальное географическое распространение *Didymium nullifilum* в условиях современного климата (~1950–2000 лет) в глобальном масштабе. Результаты MaxEnt представлены в логистическом формате (значения в легенде от 0 до 1). 1 – наблюдаемые точки присутствия.

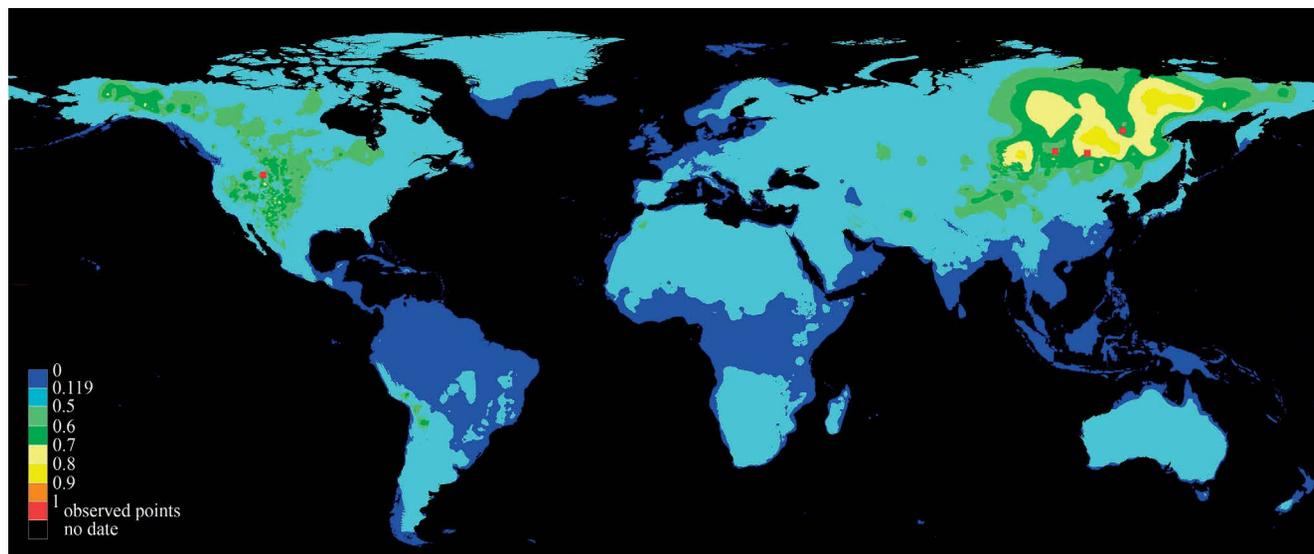


Рис. 8. Потенциальное географическое распространение *Didymium nullifilum* в условиях будущего климата (~1950–2000 years) в глобальном масштабе. Результаты MaxEnt представлены в логистическом формате (значения в легенде от 0 до 1). 1 – наблюдаемые точки присутствия.

До 2100 г. область благоприятного для вида климата существенно не изменится и его ареал не уменьшится, за исключением сокращения площади от границы порога возможного присутствия вида в 10%. В южном полушарии вероятность присутствия вида снизится, большая часть суши здесь окажется за пределами границы порога возможного присутствия вида в 10%. В Северной Америке зоны наиболее благоприятного климата также сохранятся в системах горных хребтов, потенциальный ареал будет уменьшаться на востоке, на равнинах, и, наоборот, расширяться на западе.

В Евразии область благоприятного для вида климата будет сокращаться на юге, область наиболее благоприятного климата сохранится и расширится в Восточной Сибири. Неблагоприятным для вида станет район Тибетского нагорья, в его северных и центральных районах останутся площади с вероятностью присутствия в 50–70%. В Восточной Сибири южная граница потенциального ареала сдвинется на север, а северная граница еще больше расширится.

Анализ распространения *D. nullifilum* в России, в границах наземных экорегионов Евразии (рис. 9), показывает связь с Селенгинско-Орхонской лесостепью (в Бурятии) с вероятностью присутствия вида в 50–60%, Даурской лесостепью (в Забайкалье) с вероятностью присутствия вида в 70–80%. Самая восточная точка находится в пределах Восточно-Сибирской тайги (в Якутии) с вероятностью присутствия вида 60–70%. Все точки в Евразии для вида выявлены нами впервые. Точка *D. nullifilum* в Восточносибирской тайге расположена на границе с Забайкальской лысой тундрой.

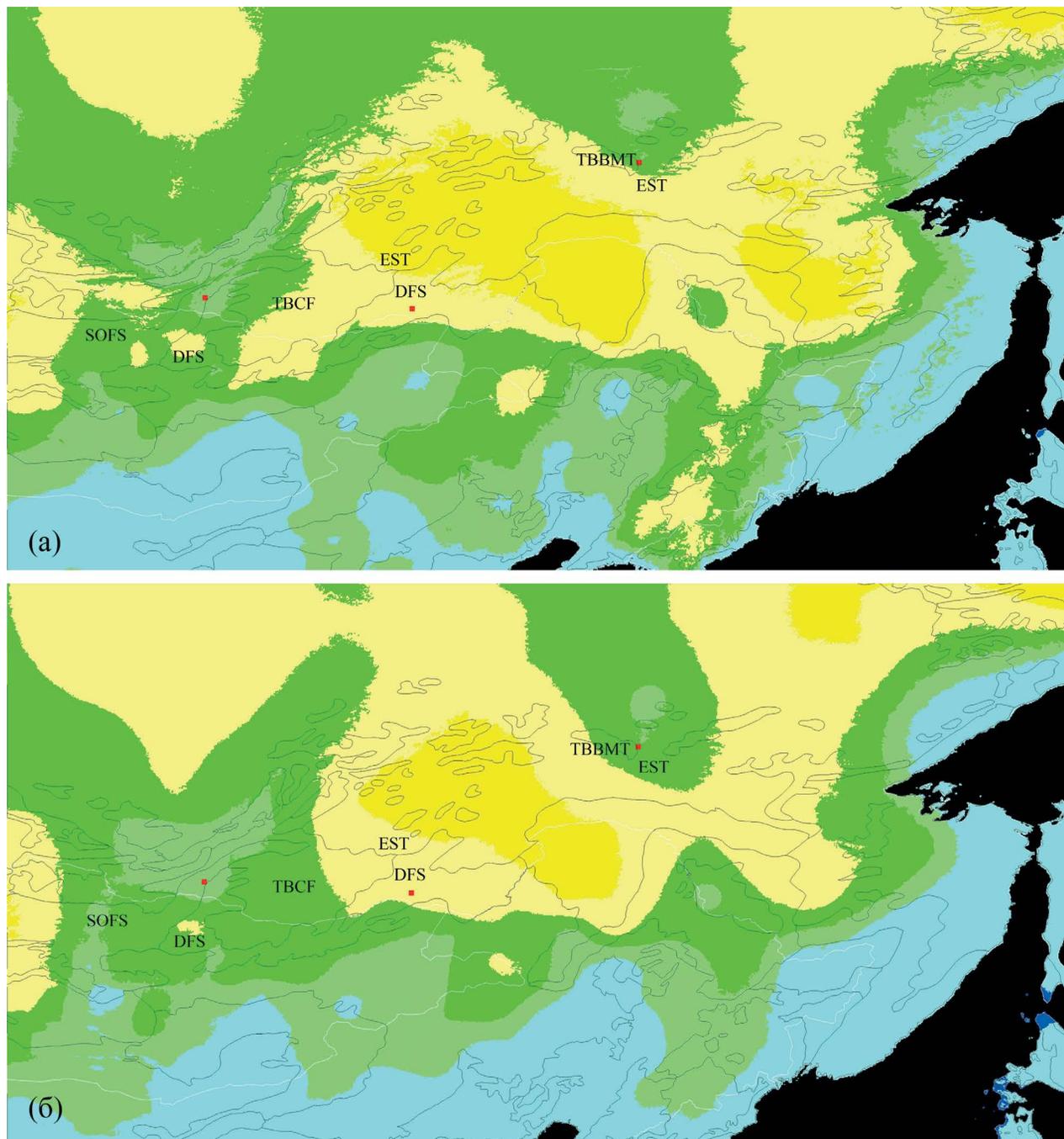
До 2100 г. площадь благоприятного для вида климата существенно не изменится. В Бурятии произойдут локальные трансграничные изменения территорий с потенциальной вероятностью присутствия в 50–70%. В Селенгинско-Орхонской лесостепи сократится зона с 60–70% вероятностью присутствия вида. В Забайкалье зона с 60–70% вероятностью присутствия вида сдвинется на север, что сделает Даурскую лесостепь более благоприятной для вида. В Восточно-Сибирской тайге значительно расширится зона с вероятностью присутствия вида от 60–70 до 70–80%.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оптимальные климатические условия для *D. mexicanum* в Евразии представлены в местообитаниях Причерноморской степи и Пустыни Каспийской низменности. Крайняя точка на восточной границе ареала вида выявлена нами в Казахской степи на территории Алтайского края. Вид впервые был выявлен нами в Евразии. На настоящий момент для него известно три местонахождения.

Оптимальные климатические условия для *D. nullifilum* в Евразии представлены в местообитаниях Селенгинско-Орхонской лесостепи в Бурятии и в Даурской лесостепи в Забайкалье. Крайняя восточная точка находится в пределах Восточно-Сибирской тайги в Якутии.

Построенные модели потенциального географического распространения для изученных видов позволяют сделать вывод о том, что *D. mexicanum* является типичным аридным видом, характерным



**Рис. 9.** Потенциальное географическое распространение *Didymium nullifilum* в границах наземных экорегионов в пределах ареала вида в Азии в условиях современного и будущего климата: а – современный климат; б – будущий климат. Красные квадраты – наблюдаемые точки присутствия. Обозначения экорегионов: SOFS – Селенгинско-Орхонская лесостепь; DFS – Даурская лесостепь (части биома Умеренные луга, саванны и кустарники); TBCF – Забайкальские хвойные леса; EST – Восточно-Сибирская тайга (части биома Бореальные леса/Тайга); TBBMT – Забайкальская лысая тундра (часть биома Тундра). Вероятность присутствия вида в условиях текущего и будущего климата указана аналогично рис. 7 и 8. Черная линия – границы экорегионов.

для пустынного биома. Но вид требователен к условиям местообитаний и способен развиваться лишь в районах с определенными биоклиматическими характеристиками. В Северной и Южной

Америке вид тяготеет к пустынным районам, прилегающим к горным хребтам Кордильер. Оптимальные для вида биоклиматические условия имеются в пустыне Чиуауа, а также в пустынных

районах Гранд Каньона и к югу от Скалистых гор. Все находки здесь сделаны в среднегорьях, на высоте 800–2000 м н.у.м., либо в высокогорьях, на высоте 2000–3000 м н.у.м. В Евразии, напротив, вид встречается на равнине – в Прикаспийской низменности на высотах до 0 м н.у.м., с некоторыми точками вплоть до 200 м н.у.м. Наша находка вида из Алтайского края также сделана в низменности на высотах 0–200 м н.у.м.

Другой вид, *D. nullifilum*, отмечен лишь в Северном полушарии, в своем распространении тяготеет к высокогорьям в Северной Америке и к низкогорьям в Евразии. Его, в отличие от предыдущего вида, нельзя считать пустынным. Но он определенно тяготеет к горным аридным местообитаниям. Вид требователен к условиям местообитаний и способен развиваться лишь в районах с определенными биоклиматическими характеристиками, которые в Евразии представлены в некоторых районах Восточной Сибири. Благоприятными для вида являются местообитания, подверженные процессам аридизации в результате антропогенной деятельности, подверженные перевыпасу.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в соответствии с государственным заданием ЦСБС СО РАН АААА-А21-121011290024-5.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### БИОЭТИКА

Опыты над живыми организмами не проводились.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aguilar M., Lado C.* Ecological niche models reveal the importance of climate variability for the biogeography of protosteloid amoebae // *The ISME Journal*. 2012. V. 6. P. 1506–1514. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.12>
- Almadrones-Reyes K.J., Dagamac N.H.* Predicting local habitat suitability in changing climate scenarios: Applying species distribution modelling for *Diderma hemisphaericum* // *Curr. Res. in Environm. and Appl. Mycol. (J. of Fung. Biol.)* 2018. V. 8. № 5. P. 492–500. <https://doi.org/10.5943/cream/8/5/2>
- Chapman D.S., Purse B.V.* Community versus single-species distribution models for British plants // *J. Biogeogr.* 2011. V. 38. № 8. P. 1524–1535. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02517.x>
- Czernyadjeva I.V., Afonina O.M., Ageev D.V., Baisheva E.Z., Bulyonkova T.M., Cherenkova N.N., Doroshina G.Ya., Drovkina S.I., Dugarova O.D., Dulepova N.A., Dyachenko A.P., Filippova N.V., Ginzburg E.G., Gogorev R.M., Himelbrant D.E., Ignatov M.S., Kataeva O.A., Kotkova V.M., Kuragina N.S., Kurbatova L.E., Kushnevskaia E.V., Kuzmina E.Yu., Melekhin A.V., Notov A.A., Novozhilov Yu.K., Popov S.Yu., Popova N.N., Potemkin A.D., Stepanchikova I.S., Stepanova V.A., Tubanova D.Ya., Vlasenko A.V., Vlasenko V.A., Voronova O.G., Zhaltov Kh.Kh.* New cryptogamic records. 4 // *Новости систематики низших растений*. 2019. Т. 53. Вып. 2. С. 431–479. <https://doi.org/10.31111/nsnr/2019.53.2.431>
- Dagamac N.H.A., Bauer B., Woyzichowski J., Shchepin O.N., Novozhilov Yu.K., Schnittler M.* Where do nivicolous myxomycetes occur? – Modeling the potential worldwide distribution of *Physarum albescens* // *Fung. Ecol.* 2021. V. 53. 101079. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2021.101079>
- Guisan A., Thuiller W.* Predicting species distribution: offering more than simple habitat models // *Ecol. Lett.* 2005. V. 8. № 9. P. 993–1009. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01044.x>
- Guisan A., Zimmermann N.E.* Predictive habitat distribution models in ecology // *Ecol. Modell.* 2000. V. 135. № 2–3. P. 147–186. [https://doi.org/10.1016/S0304-3800\(00\)00354-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3800(00)00354-9)
- Guo Y., Li X., Zhao Z., Wei H., Gao B., Gu W.* Prediction of the potential geographic distribution of the ectomycorrhizal mushroom *Tricholoma matsutake* under multiple climate change scenarios // *Scient. Report.* 2017. V. 7. 46221. <https://doi.org/10.1038/srep46221>
- Hijmans R.J., Cameron S.E., Parra J.L., Jones P.G., Jarvis A.* Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas // *Int. J. Climatol.* 2005. V. 25. P. 1965–1978. <https://doi.org/10.1002/joc.1276>
- Hijmans R.J., Guarino L., Mathur P.* DIVA-GIS Version 7.5 Manual. 2012. Available from Available from: [http://diva-gis.org/docs/DIVA-GIS\\_manual\\_7.pdf](http://diva-gis.org/docs/DIVA-GIS_manual_7.pdf) (accessed 15th of May 2023)
- Limbo-Dizon J.E., Almadrones-Reyes K.J., Macabago S.A.B., Dagamac N.H.A.* Bioclimatic modeling for the prediction of the suitable regional geographical distribution of selected bright-spored myxomycetes in the Philippine archipelago // *Biodiv. J. Biol. Div.* 2022. V. 23. № 5. P. 2285–2294. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230506>
- Olson D.M., Dinerstein E., Wikramanayake E.D., Burgess N.D., Powell G.V.N., Underwood E.C., D'Amico J.A., Itoua I., Strand H.E., Morrison J.C.,*

- Loucks C.J., Allnutt T.F., Ricketts T.H., Kura Y., Lamoreux J.F., Wettengel W.W., Hedao P., Kassam K.R. Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth: A new global map of terrestrial ecoregions provides an innovative tool for conserving biodiversity // *BioScience*. 2001. V. 51. № 11. P. 933–938.  
[https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0933:TEOTWA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0933:TEOTWA]2.0.CO;2)
- Phillips S.J., Dudík M. Modeling of species distributions with MaxEnt: new extensions and a comprehensive evaluation // *Ecography*. 2008. V. 190. P. 231–259.  
<https://doi.org/10.1111/j.0906-7590.2008.5203.x>
- Phillips S.J., Anderson R.P., Schapire R.E. Maximum entropy modeling of species geographic distributions // *Ecol. Modell.* 2006. V. 190. P. 231–259.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2005.03.026>
- Pietras M., Litkowiec M., Gołębiewska J. Current and potential distribution of the ectomycorrhizal fungus *Suillus lakei* (Murrill) A.H. Sm. et Thiers in its invasion range // *Mycorrhiza*. 2018. V. 28. P. 467–475.  
<https://doi.org/10.1007/s00572-018-0836-x>
- Scheldeman X., Van Zonneveld M. Training manual on spatial analysis of plant diversity and distribution. Rome: Biodiversity International, 2010. P. 1–179. Available from: [https://www.biodiversity-international.org/fileadmin/\\_migrated/uploads/tx\\_news/Training\\_manual\\_on\\_spatial\\_analysis\\_of\\_plant\\_diversity\\_and\\_distribution\\_1431\\_07.pdf](https://www.biodiversity-international.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/Training_manual_on_spatial_analysis_of_plant_diversity_and_distribution_1431_07.pdf) (доступ 15 мая 2023)
- Segurado P., Araújo M.B. An evaluation of methods for modelling species distributions // *J. Biogeogr.* 2004. V. 31. P. 1555–1568.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2004.01076.x>
- Yuan H.-Sh., Wei Yu-L., Wang X.-G. MaxEnt modeling for predicting the potential distribution of *Sanghuang*, an important group of medicinal fungi in China // *Fung. Ecol.* 2015. V. 17. P. 140–145.  
<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.001>
- Vlasenko V.A., Dejidmaa T., Dondov B., Ochirbat E., Kherlenchimeg N., Javkhlan S., Burenbaatar G., Uranchimeg A., Asbaganov S.V., Vlasenko A.V. Distribution and ecological niche modeling of a rare species *Poronia punctata* in Asia // *Curr. Res. in Environm. and Appl. Mycol. (J. of Fung. Biol.)*. 2021. V. 11. № 1. P. 468–484.  
<https://doi.org/10.5943/cream/11/1/32>
- Vlasenko A.V., Novozhilov Yu.K., Vlasenko V.A., Korolyuk A. Yu., Dulepova N.A. New data on the obligate coprophilous myxomycetes of Siberia // *The Bulletin of Irkutsk State University. Series: Biology and Ecology*. 2017. V. 21. P. 50–60.
- Zurell D., Franklin J., König C., Bouchet P.J., Dormann C.F., Elith J., Fandos G., Feng X., Guillera-Aroita G., Guisan A., Lahoz-Monfort J.J., Leitão P.J., Park D.S., Townsend Peterson A., Rapacciuolo G., Schmatz D.R., Schröder B., Serra-Diaz J.M., Thuiller W., Yates K.L., Zimmermann N.E., Merow C. A standard protocol for reporting species distribution models // *Ecography. A journal of space and time in ecology*. 2020. V. 43. № 9. P. 1261–1277.  
<https://doi.org/10.1111/ecog.04960>

## Habitat Suitability and Areal Dynamics of Rare Desert Species of Myxomycetes of the Genus *Didymium* Under Global Climate Change in Asia

A. V. Vlasenko<sup>#</sup>, V. A. Vlasenko<sup>#</sup>

Central Siberian Botanical Garden SB RAS, st. Zolotodolinskaya, 101, Novosibirsk, 630090 Russia  
<sup>#</sup>E-mail: vlasenkomyces@mail.ru; anastasiyamix81@mail.ru

The ability to determine the spatial distribution of rare species is critical to understanding the environmental factors that influence them. Maximum entropy (MaxEnt) modeling of spatial distributions addresses this problem by allowing inferences about species distributions under environmental change from occurrence data. Using this method, we mapped the current and potential geographic distribution of two rare species of desert myxomycetes, *Didymium mexicanum* and *Didymium nullifilum*. Models of potential global species distributions were created using bioclimatic data and MaxEnt software to model species habitat suitability under current conditions (~1950–2000) and under projected changes in future climate (2100 AD) based on 18 spatial distribution points for *D. mexicanum* and 4 points for *D. nullifilum*. A detailed morphological description is given for the species. We identified the species *D. mexicanum* for the first time in Asia.

**Keywords:** species distribution modeling, rare species, *Didymium mexicanum*, *Didymium nullifilum*

УДК 574.522

## ПОКАЗАТЕЛИ МЕТАБОЛИЗМА АМФИПОД *GAMMARUS OCEANICUS*, ПОДВЕРГШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ ОКТИЛФЕНОЛА (4Т-ОФ)

© 2024 г. Н. А. Березина\*, @, Ю. И. Губелит\*, Л. Г. Бакина\*\*,  
А. В. Егорова\*\*, С. В. Холодкевич\*\*

\*Зоологический институт Российской академии наук,  
Университетская наб. 1, г. Санкт-Петербург, 199034 Россия

\*\*Санкт-Петербургский федеральный исследовательский центр Российской академии наук,  
14-я линия В.О. 39, Санкт-Петербург, 199178 Россия

@E-mail: nadezhda.berezina@zin.ru

Поступила в редакцию 26.12.2023 г.

После доработки 02.07.2024 г.

Принята к публикации 03.07.2024 г.

Нарастающее воздействие деятельности человека на биосферу требует исследования последствий воздействия опасных токсических веществ на водные экосистемы. Исследованы экофизиологические показатели амфипод *Gammarus oceanicus* Segerstråle, 1947, такие, как скорости потребления пищи, потребления кислорода и экскреции фосфатов (выделяющихся с мочой организма), для того, чтобы определить реакции этих рачков на воздействие малоизученного микрозагрязнителя антропогенного происхождения, ксеноэстрогена, 4-трет-октилфенола (4т-ОФ). Через 28 дней воздействия наименьших концентраций 4т-ОФ (0.25 мкг/л) выявлено снижение пищеварительной и выделительной активности ракообразных, а уровень потребления кислорода был аналогичен значениям у контрольных рачков. Все изученные показатели тестируемых животных значительно изменялись после такого же времени воздействия 2.5 мкг/л 4т-ОФ, показывая неблагоприятное влияние на функционирование организма рачков. Полученные данные могут быть использованы для разработки критериев качества водной среды.

**Ключевые слова:** скорость потребления пищи, дыхательная активность, кислород, экскреция фосфатов, адаптивные возможности, ксеноэстрогены

**DOI:** 10.31857/S1026347024060131, **EDN:** ujnvh

В последние несколько лет возникло много опасений относительно экологической безопасности поверхностно-активных веществ на основе алкилфенолполиэтоксилатов. Они широко используются в моющих средствах, красках, гербицидах, производстве пластика и многих других продуктах. Подсчитано, что 60% этих веществ попадают в водную среду. Они биоразлагаемы и трансформируются в алкилфенолы, такие как нонилфенол и октилфенол, которые гидрофобны и могут накапливаться в водных организмах (Isidori *et al.*, 2006). Эти вещества обнаруживаются в определяемых количествах в пресных водоемах, питьевой воде, устьях рек и морских экосистемах разных регионов мира (Bina *et al.*, 2018; Cheng *et al.*, 2018; Lalonde, Garron 2021; Prasad *et al.*, 2023), поэтому изучение их потенциального воздействия на гидробионтов является актуальной задачей.

Октилфенолы (ОФ) относятся к наиболее токсичным и стойким загрязнителям в окружающей среде. Октильная группа в их структуре либо

линейна, либо располагается во втором, третьем или четвертом положении бензольного кольца, формируя изомеры. Из них 4-трет-октилфенол (4т-ОФ) наиболее часто используется в промышленности (Miyagawa *et al.*, 2021).

Биоаккумуляция ОФ во внутренних органах живущих в воде организмов значительна, уровень их содержания в теле может быть в 10–1000 раз выше, чем в окружающей среде (Isidori *et al.*, 2006). Известно, что ОФ обладают эстрогеномиметическими свойствами. Реакции эндокринного характера у водных организмов, вызываемые присутствием ОФ, широко обсуждаются в литературе (David *et al.*, 2009; Rey Vázquez *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2014; Meijide *et al.*, 2016). Выявлено, что присутствие ОФ даже в небольших концентрациях 0.5 мкг/л в водной среде может быть причиной серьезных репродуктивных нарушения у амфипод: феминизации у самцов, аномалий у эмбрионов и снижения фертильности у самок (Березина и др., 2024). Нарушение метаболических показателей (скорости

потребления кислорода) отмечено при концентрациях 4т-ОФ > 5 мкг/л (Березина и др., 2024). ОФ способны влиять и на функционирование сообществ микроорганизмов. В частности, 4т-ОФ влияли на метаболизм цианобактерий *Planktothrix agardhii*, активируя работу их систем антиоксидантной защиты (Zaytseva, Medvedeva, 2019). Однако до сих пор сублетальные эффекты (т.е. не приводящие в целом к гибели организма) этих веществ на многие физиологические функции водных животных остаются малоизученными. Кроме того, не определен нижний предел концентраций 4т-ОФ, вызывающих реакции в различных биологических системах водных животных.

Целью настоящего экспериментального исследования было изучение возможных нарушений энергетического обмена, показателей питания, дыхания и экскреции у амфипод (на примере вида *Gammarus oceanicus* Segerstråle, 1947) при экспериментальном воздействии октилфенола 4т-ОФ. Ракообразные *G. oceanicus*, выбранные для данного исследования, относятся к отряду *Amphipoda* и являются важными компонентами прибрежных сообществ морских экосистем, Балтийского и Белого морей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Схема эксперимента.** Проведение опыта происходило в ноябре 2020 г. в лаборатории Биоэлектронных методов геоэкологического мониторинга НИЦЭБ РАН. Амфипод *G. oceanicus* (длиной тела 13–18 мм) отбирали в прибрежье Кандалакского залива Белого моря и транспортировали в лабораторию, где содержали в искусственной морской воде соленостью 24‰ (промилле) при  $T = 10.0 \pm 0.8^\circ\text{C}$ . Соленость воды контролировали ежедневно при помощи рефрактометра. Для приготовления растворов загрязнителя использовали морскую воду и химически чистый 4-терт-октилфенол 97%,  $(\text{CH}_3)_3\text{CCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ , Sigma-Aldrich. Искусственная морская вода соленостью 24‰ была предварительно приготовлена с использованием соли BIO-ACTIF от компании Tropic Marin® и дистиллированной воды. Она хранилась в большом аквариуме при аэрации и температуре воды  $10^\circ\text{C}$ . 4т-ОФ сначала растворяли в ацетоне и затем в морской воде до уровня 25 мкг/л. Таким способом получали маточный раствор. Эту расчетную концентрацию 4т-ОФ контролировали путем аналитического измерения. Фактическое содержание 4т-ОФ было определено как 25.6 мкг/л.

Далее маточный раствор использовали для приготовления сред, соответствующих двум вариантам 0.25 мкг/л (вариант 1) и 2.5 мкг/л (вариант 2) — путем разбавления его морской водой в 100 и 10 раз. В качестве контроля использовали морскую воду.

В контроле содержание 4т-ОФ было ниже пределов обнаружения метода, т.е. вещество здесь не обнаружено.

Воздействие на амфипод (по 20 экз.) в аквариумах объемом 2 л продолжалось 28 сут. Каждый вариант повторяли в 6 сериях. Выбор таких экспериментальных концентраций и времени воздействия 4т-ОФ был определен в результате предварительных опытов. Ранее (Березина и др., 2024), для другого вида *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing 1899) было показано, что концентрация 4т-ОФ 0.5 мкг/л не оказывала заметного эффекта на метаболическую активность рачков, оцениваемую по скорости потребления кислорода после 7 сут воздействия. Кроме этого, ранее было показано, что токсическая активность исследуемого соединения на ракообразных лучше выражена при долгосрочном воздействии (Isidori *et al.*, 2005).

Аквариумы были накрыты для избегания испарения воды. Каждые 7 сут. отмечали смертность рачков. Постоянная аэрация воды была обеспечена на уровне насыщения. Рачков обеспечивали субстратом, кормление, измерение температуры и солености воды проводили ежедневно. Фотопериод был установлен 8:16 ч (день: ночь) в соответствии со временем проведения эксперимента.

**Аналитическое измерение 4т-ОФ.** Пробу воды объемом 0.5 л хранили в холоде при температуре  $-20^\circ\text{C}$  до анализа. Перед анализом пробы проводили жидкость-жидкостную экстракцию (трижды по 15 мл гексана) при нейтральном значении рН среды. Полученные экстракты сушили над безводным сульфатом натрия, пробы упаривали на роторном испарителе. Затем экстракт перенесли в коническую пробирку и упаривали досуха под током азота. После этого к высушенным экстрактам добавляли 50 мкл дериватирующего агента N,O-бис(триметил)-трифторацетамида и помещали в термостат на 30 мин при  $60^\circ\text{C}$ . Оценка количественного содержания обнаруженных соединений проводилась с применением метода «внутреннего стандарта» (2-фторнафталин), который вводился в пробу непосредственно перед процедурой экстракции. Анализ алкилфенолов проводился в целевом режиме SIM (Selection Ion Monitoring) на хромато-масс-спектрометре (ГХ/МС) единичного разрешения QP 2010 (Shimadzu). Параметры ГХ/МС съемки были следующими: температура ионного источника —  $200^\circ\text{C}$ , интерфейса —  $270^\circ\text{C}$ , инжектора —  $250^\circ\text{C}$ , режим с постоянной скоростью потока газа-носителя (гелий) — 1.0 мл/мин. Энергия ионизации — 70 эВ. При анализе использовалась капиллярная колонка средней полярности TR-5MS ( $60 \times 0.25 \times 0.25 \text{ мм}^3$ ). Объем вводимой пробы составлял 1 мкл. Термостат колонки нагревали по следующей программе: начальная температура  $60^\circ\text{C}$  выдерживалась в течение 1 мин, затем колонку нагревали со скоростью  $15^\circ\text{C}/\text{мин}$

до 280°C (с 5-минутным выдерживанием). Общее время хроматографирования составило 31 мин. Предел количественного измерения 4т-ОФ составил 0.01 мкг/л.

*Физиологические показатели амфипод.* Для решения вопросов о влиянии на метаболическую активность рачков были оценены скорости потребления пищи, кислорода и экскреторной активности после 28 сут воздействия 4т-ОФ в концентрациях 0.25 и 2.5 мкг/л и в контроле.

Скорость потребления пищи определяли в краткосрочных экспериментах после воздействия 4т-ОФ на амфипод в чистой среде путем учета разницы между начальной и конечной массой пищи. В качестве пищи предоставляли кусочки живых фукусов *Fucus vesiculosus* Linnaeus 1753 из литорали губы Чупа, Белое море. Предварительно их тщательно промывали.

Испытуемых животных не кормили в течение 12 ч перед началом экспозиции, чтобы их кишечник оставался пустым. Беспозвоночных высаживали поодиночке в небольшие сосуды (чашки Петри) с точно взвешенным количеством растений, не меняя условия содержания. Масса пищи была в избытке, но примерно равной (0.25 г) во всех трех вариантах. Длительность опыта – 48 ч. Всего исследовали 10 амфипод в каждом варианте. По окончании опыта определяли массу оставшегося растительного материала и массу амфипод. Сырую массу водорослей и животных определяли на весах Pioneer PX124 (ОНАУС Corporation, США) точностью 0.01 мг.

Скорость потребления пищи ( $C$ , мг) животными рассчитывали по количеству внесенного и оставшегося растительного материала. Для контроля потери массы фукуса от естественного разложения и других причин отдельно экспонировали сходные по массе навески водорослей без амфипод. Скорость потребления пищи представлена как относительная величина ( $C_w$ ) в единицах массы в сутки, равная отношению рациона ( $C$ , количества потребленной фитомассы) к сырой массе тела ( $WW$ ) животных за сутки:

$$C_w = C / WW.$$

Скорость потребления кислорода (СПК) и экскреции фосфатов (Ех) амфиподами определяли в серии отдельных опытных измерений по методике, описанной ранее (Berezina, 2023). Экспозиция составила 4 ч при постоянной температуре 10°C. Кислородные склянки (респирометры) наполняли чистой, обогащенной кислородом водой, рачков рассаживали по одному или по несколько экземпляров (для мелких особей) и давали им возможность перейти в спокойное состояние в течение 0.5 ч. Затем склянки (30–250 мл) плотно закрывали и погружали в аквариум с температурой

воды 10°C, воду в аквариуме непрерывно перемешивали. Контрольные склянки с морской водой без организмов экспонировались в таких же условиях. Респирометры промывали этанолом и деминерализованной водой и затем сушили. Бактериальный фон потребления кислорода таким образом был минимизирован.

Величины СПК и Ех рассчитывали по разнице между уровнями кислорода и фосфатов в опыте и контроле. Рассчитывали удельные массовые скорости потребления кислорода и выделения фосфатов, т.е., количество кислорода, поглощенного и фосфора, выделенного на 1 мг сырой массы тела рачков за один час. Затем для сравнения эти удельные величины пересчитывались для особи средней массы 55 мг. Влажную массу животных определяли путем взвешивания на весах Pioneer PX124 (ОНАУС Corporation, США) с точностью 0.01 мг после измерения кислорода и фосфатов в воде.

*Измерение кислорода.* Растворенный кислород измеряли с помощью цифрового оксиметра Edge DO HI2004 (HANNA) с полярографическим датчиком содержания растворенного кислорода по типу ячейки Кларка (точностью 1.5%), откалиброванного перед началом измерений по стандарту. При измерении кислорода воду в сосуде перемешивали с помощью магнитной мешалки.

*Измерение фосфатов.* Содержание фосфатов в воде определяли молибдатным методом согласно ГОСТ 18309-2014 (2015). Были изготовлены градуировочные растворы и рабочие растворы однозамещенного фосфорнокислого калия, молибденовокислого аммония серной и соляной кислот и двухлористого олова. Одновременно готовили две параллельные пробы. В мерные колбы вместимостью 50 мл вносили 50 мл анализируемой воды, профильтрованной через плотный бумажный фильтр “синяя лента”, 1 мл кислого раствора молибденовокислого аммония, и 0.1 мл рабочего раствора двухлористого олова. Измерения оптической плотности анализируемых проб проводили при длине волны 690 нм. Концентрации фосфатов в пробе находили по коэффициенту градуировочной характеристики, затем рассчитывали среднеарифметические измеренных величин параллельных проб.

*Статистика.* Полученные данные обрабатывали статистически, рассчитывали средние величины и их стандартные ошибки. Различия между вариантами анализировали с помощью теста Манна–Уитни в PAST 3.14.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Об интенсивности метаболизма гидробионтов, в первую очередь, можно судить по двум показателям – скорости потребления кислорода и экскреции биогенных веществ. Метаболические процессы

в любом организме тесно связаны с дыханием, так как окислительные процессы, при которых поглощается кислород и выделяется углекислый газ, служат источником энергии. Поэтому потребление кислорода хорошо отражает энергетический обмен в организме (Алимов, 1979; Glazier, 2015). Экскретируемые животными биогены образуются как конечный результат метаболизма, поэтому выделение определенного количества веществ за единицу времени также может свидетельствовать об интенсивности обмена веществ в организме в целом. Животные в основном экскретируют фосфор в растворенном виде в форме ортофосфатов через пищевой тракт с выделением мочи, покровы тела и жабры (Vanni, 2002). Уровень выделения фосфора непосредственно связан с уровнем потребления кислорода водными животными, расходуемого в процессе метаболизма на окисление органических веществ в их тканях (Гутельмахер, 1986; Голубков, 2014). Уровень потребления пищи животными является также важным показателем энергетического обмена, влияющим на их рост и общее состояние организма. Также он определяет и уровень экскретируемых организмом веществ (в том числе фосфатов).

В проведенном эксперименте отсутствие смертности рачков через 7, 14 и 21 сут отмечали при всех концентрациях 4т-ОФ и в контроле. В конце опыта (28 сут) смертность в контроле и варианте 2 была 3.3%, 5% и 8.3% соответственно. Скорость потребления пищи была самой высокой в контроле, составляя примерно 16% от массы тела в сут. По этому показателю выявлены существенные отличия амфипод в варианте 1 и 2 (рис. 1). В варианте 2 скорость потребления пищи была почти в 3 раза ниже, чем в контроле. Скорость потребления

кислорода значимо не различалась между вариантом 1 и контролем, а в варианте 2 была значимо ниже (примерно на 50%), чем в контроле (рис. 2). Скорость экскретирования фосфатов в первую очередь связана с уровнем потребления пищи, так как основное количество фосфатов выводится с мочой. Также эта величина отражает уровень метаболизма организма. Хотя между вариантом 1 и контролем не было выявлено различий в уровне аэробного метаболизма, скорость экскреции фосфатов была существенно ниже, чем в контроле, что, скорее, связано с уменьшением уровня потребляемой пищи. Еще большие различия обнаружены между вариантом 2 и контролем (рис. 3).

Ранее (Березина и др., 2024) при воздействии 0.5 мкг/л 4т-ОФ не было выявлено отличий в величинах СПК от контроля у другого вида амфипод, *G. fasciatus*, при коротком воздействии (7 сут). Проведенный эксперимент по долговременному воздействию (28 сут) этого загрязнителя показывает сходный результат (т.е. отсутствие отличий от контроля) при 0.25 мкг/л 4т-ОФ. Однако при концентрации 2.5 мкг/л 4т-ОФ (после 28 сут воздействия) величины СПК были статистически значимо выше, чем в контроле и при 0.25 мкг/л 4т-ОФ. Повышенные энергетические затраты при таком уровне воздействия показывают реакцию организма на стресс и являются следствием нарушения внутреннего гомеостаза. Повышение энергетических трат водных животных наблюдали при воздействии других токсических веществ, таких как диклофенак (Berezina *et al.*, 2022), тяжелые металлы (Irshad *et al.*, 2021). Стресс-реакции и нарушения метаболизма рыб были выявлены при загрязнении нефтепродуктами (Nwizugbo *et al.*, 2023).

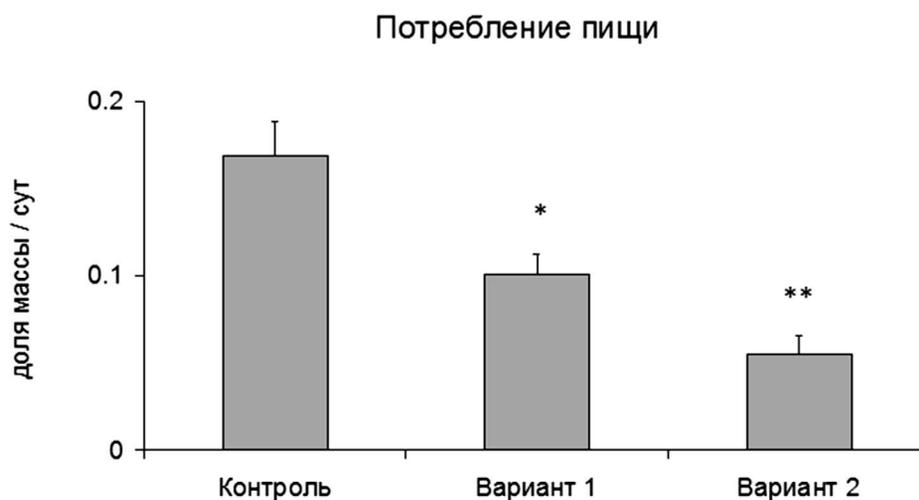
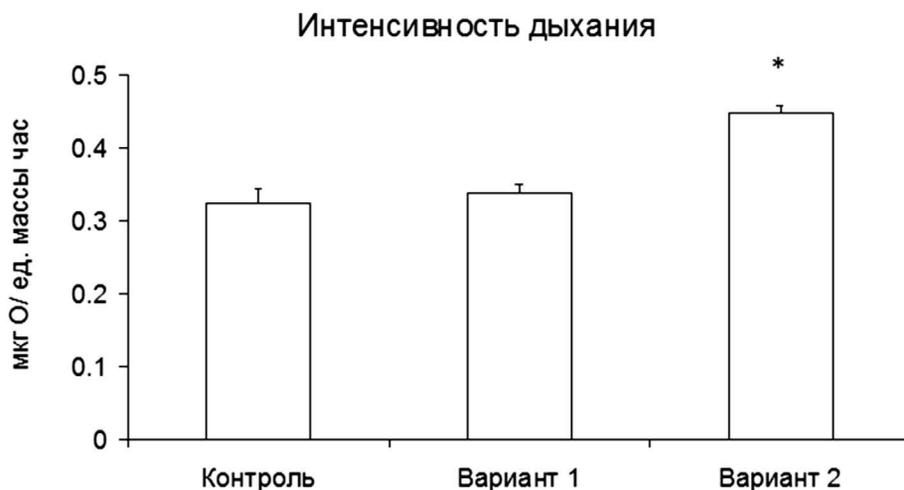
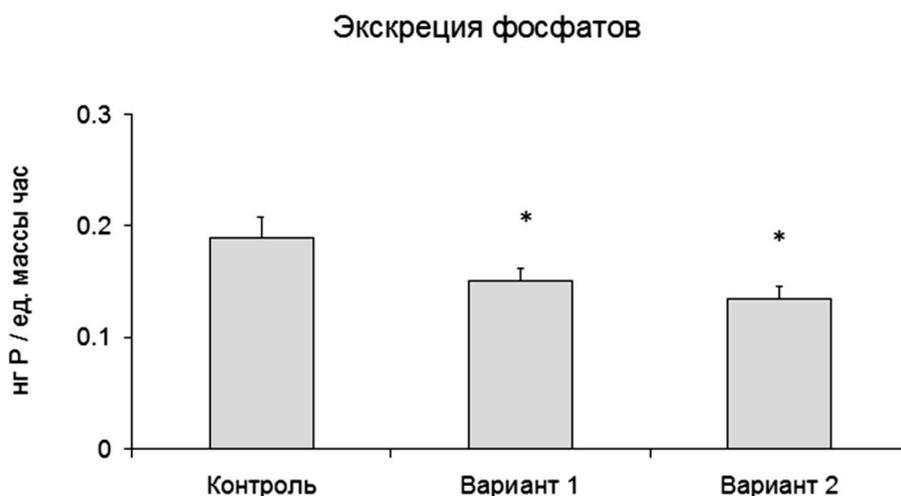


Рис. 1. Удельная скорость потребления пищи амфиподами *G. oceanicus* в контроле и при воздействии 4т-ОФ (4-трет-октилфенола). \* – различия с контролем статистически значимы при  $p < 0.05$ .



**Рис. 2.** Удельная скорость потребления кислорода амфиподами *G. oceanicus* в контроле и при воздействии 4т-ОФ (4-трет-октилфенола). \* – различия с контролем статистически значимы при  $p < 0.05$ , а \*\* – при  $p < 0.01$ .



**Рис. 3.** Удельная скорость выделения фосфатов амфиподами *G. oceanicus* в контроле и при воздействии 4т-ОФ (4-трет-октилфенола). \* – различия с контролем статистически значимы при  $p < 0.05$ .

Снижение «аппетита» (пониженные уровни потребления пищи по сравнению с контролем) и соответствующее уменьшение уровня экскреции фосфатов отмечено у амфипод, содержащихся 28 сут при обеих концентрациях 4т-ОФ (0.25 и 2.5 мкг/л). По-видимому, низкие уровни экскреции фосфатов (т.е. ухудшение функций выделительной системы) также связаны и со снижением уровня потребляемой пищи (суточного рациона) рачками в присутствии 4т-ОФ, свидетельствует о токсическом влиянии этого вещества и снижении общей адаптивности организма. Сходно, в других случаях воздействия различных токсических веществ наблюдали ухудшение пищеварительной функции организмов и снижение рациона. Так, например, под воздействием ртути количество потребляемой пищи

карпом уменьшилось на 38%, а латентный период между приемами пищи увеличился (Kuz'mina *et al.*, 2019). Также трофическая ниша озерной лягушки в условиях загрязнения тяжелыми металлами сокращалась, в отличие от контрольной точки (Заринова и др., 2013). Показано, что добавление 4т-ОФ в пищу рыбы-кролика (род *Siganus*) в концентрации от 5 до 125 мкг/г массы тела рыбы привело к необратимым гистопатологическим изменениям в пищеварительной системе (в печени, селезенке, кишечнике), которые усугублялись по мере увеличения концентрации и длительности воздействия (Du *et al.*, 2008). Другие исследования на амфибиях показали, что ОФ влияют на липидный обмен, что приводит к изменению структуры и состава их кишечного микробиома (Liu *et al.*, 2020).

Энергетический обмен, включающий в себя усвоение, преобразование и использование энергии, является ключевым физиологическим процессом, связанным с ростом и размножением живых организмов (White., 2022). Нарушение внутреннего гомеостаза организма при действии изученного ксенобиотика привело к увеличению энергетических потребностей организма, поскольку для восстановления гомеостаза в этом случае требовалась дополнительная энергия. Это выразилось в увеличении количества потребляемого кислорода (при 2.5 мкг/л). При этом снижение пищеварительной и выделительной активности рачков отмечено при воздействии обеих тестируемых концентраций 4т-ОФ. Это связано с тем, что ОФ, как и другие ксенобиотики, влияют на распределение энергии среди процессов поддержания жизненно важных функций организмов, оказавшихся в стрессовом состоянии (Killen *et al.*, 2013; Sokolova, 2021). Данные свидетельствуют об экономии организмом энергии на процессы питания и выделения и перераспределении энергии в пользу дыхательной активности. В данном случае ускорение метаболических реакций может быть связано с активацией организмом механизмов детоксикации ксенобиотика. В целом, длительное воздействие 4т-ОФ (при концентрации 2.5 мкг/л) неблагоприятно для организма рачков, поскольку снижает общие адаптивные возможности и может сказаться на их соматическом и репродуктивном росте.

Точный механизм, посредством которого ОФ модулируют функции организма, остается неизвестным. Благодаря связывающей способности ОФ к белкам митохондрий, возможно, они участвуют в ингибировании активности ферментов синтеза АТФ. Если при этом не блокируется окисление (транспорт электронов и протонов) в цикле Кребса, то, соответственно, резко возрастают потребности организма в кислороде и производстве энергии для преодоления стресса, вызываемого этим ксенобиотиком. В основе токсических эффектов ОФ лежит окислительный стресс, который проявляется в образовании избыточного количества активных форм кислорода (АФК) и других радикалов в клетках (Li *et al.*, 2018). Двойственный характер действия активных форм радикалов заключается в том, что при их низких концентрациях проявляется митогенный или пролиферативный сигнальный эффект, т.е. инициируется адаптивная защита клеток от токсического воздействия, а при их высоких концентрациях происходит повреждение всех биомолекул и самой клетки (Moldogazieva *et al.*, 2020). Продукция АФК митохондриями может приводить к окислительному повреждению митохондриальных белков, мембран и ДНК, нарушая способность митохондрий не только синтезировать АТФ, но и выполнять широкий спектр важнейших метаболических функций (Murphy, 2009; Fang *et al.*, 2015; Weidinger, Kozlov 2015). Так,

воздействие малых доз (сходных с примененных нами) ОФ на лягушек вызывало окислительный стресс в их печени, приводило к снижению активности антиоксидантных ферментов и повреждению органелл гепатоцитов, включая деформацию митохондрий и конденсацию их ядер (Li *et al.*, 2018).

В заключении отметим, что нами впервые изучена реакция амфипод *G. oceanicus* на присутствие в среде малоизученного микрозагрязнителя антропогенного происхождения, 4т-ОФ. Все изученные физиологические показатели тестируемых животных – интенсивность потребления пищи, дыхательная активность (= скорость потребления кислорода) и уровень экскреции фосфатов (выделяемых с мочой организмов) – изменялись при длительном (28 сут) воздействии загрязнителя в концентрации 2.5 мкг/л, что свидетельствует о неблагоприятном влиянии таких доз и продолжительности воздействия 4т-ОФ на организм ракообразных. Полученные данные могут быть использованы для разработки рекомендаций по включению этого опасного загрязнителя в программы мониторинга качества водной среды.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа финансировалась Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (госзадания 122031100274-7, 122041100086-5, 122041100085-8) и Программой приграничного сотрудничества России и Эстонии, проект ER90 HAZLESS (2019–2022 гг.).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

При экспериментах с животными соблюдались применимые этические нормы. Разрешение № 1–5/ 14.02.2022 г. предоставлено Комиссией по Биоэтике ЗИН РАН.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алимов А. Ф. Интенсивность обмена у водных пойклотермных животных // Общие основы изучения водных экосистем. Л.: Наука, 1979. С. 5–20.
- Березина Н. А., Сухих Н. М., Егорова А. В., Жаковская З. А. Физиологические и репродуктивные нарушения у балтийских амфипод *Gmelinoides fasciatus* при экспериментальном воздействии

- 4-трет-октилфенола // Сибирский экологический журнал. 2024. №2. С. 208–219.  
<https://doi.org/10.15372/SEJ20240203>
- Голубков С.М. Масса тела и экскреция фосфора водными беспозвоночными // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2014. № 1. С. 86–91.  
<https://doi.org/10.7868/S0002332914010068>
- ГОСТ 18309-2014 // Вода. Методы определения фосфорсодержащих веществ (ISO 6878:2004, NEQ). Издание официальное. Москва: Стандартинформ, 2015. 24 с.
- Гутельмахер Б.Л. Метаболизм планктона как единого целого. Л.: Наука, 1986. 155 с.
- Заринова Ф.Ф., Файзуллин А.И., Кузовенко А.Е. Особенности питания озерной лягушки в условиях техногенного загрязнения тяжелыми металлами (Республика Башкортостан) // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. 2013. Т. 18, № 4. С. 1279–1282.
- Berezina N.A. Energy metabolism of crustaceans (Amphipoda) from the northern populations (White Sea basin) // Russian Journal of Ecology. 2023. V. 54. P. 62–69.  
<https://doi.org/10.1134/S1067413623010022>
- Berezina N.A., Sharov A.N., Chernova E.N., Malysheva O.A. Effects of Diclofenac on the reproductive health, respiratory rate, cardiac activity, and heat tolerance of aquatic animals // Environ. Toxicol. Chem. 2022. V. 41. P. 677–686.  
<https://doi.org/10.1002/etc.5278>
- Bina B., Mohammadi F., Amin M.M., Pourzamani H.R., Yavari Z. Determination of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol compounds in various types of wastewater and their removal rates in different treatment processes in nine wastewater treatment plants of Iran // Chin. J. Chem. Eng. 2018. V. 26. P. 183–190.  
<https://doi.org/10.1016/j.cjche.2017.04.009>
- Cheng J.R., Wang K., Yu J., Yu Z.X., Yu X.B., Zhang Z.Z. Distribution and fate modeling of 4-nonylphenol, 4-t-octylphenol, and bisphenol a in the Yong River of China // Chemosphere. 2018. 195. P. 594–605.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.085>
- David A., Fenet H., Gomez E. Alkylphenols in marine environments: Distribution monitoring strategies and detection considerations // Mar. Pollut. Bull. 2009. V. 58. 7. P. 953–960.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.04.021>
- Dong R.R., Yang S.J., Feng R.J., Fang L.L., Sun Y.L., Zhang Y.G., Wang D.S. Complete feminization of catfish by feeding *Limnodilus*, an annelid worm collected in contaminated streams // Environ. Res. 2014. V.133. P. 371–379.  
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.05.018>
- Du Y.B., Li Y.Y., Zhen Y.J., Hu C.B., Liu W.H., Chen W.Z., Sun Z.W. Toxic effects in *Siganus oramin* by dietary exposure to 4-tert-octylphenol // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2008. V. 80. 6. P. 534–538.  
<https://doi.org/10.1007/s00128-008-9388-7>
- Fang Q., Shi X., Zhang L., Wang Q., Wang X., Guo Y., Zhou B. Effect of titanium dioxide nanoparticles on the bioavailability, metabolism, and toxicity of pentachlorophenol in zebrafish larvae // J. Hazard. Materials. 2015. V. 283. P. 897–904.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.039>
- Glazier D.S. Is metabolic rate a universal “pacemaker”- for biological processes? // Biol. Rev. 2015. V. 90. 2. P. 377–407.  
<https://doi.org/10.1111/brv.12115>
- Irshad K., Rehman, K., Fiayyaz, F., Sharif, H., Murtaza, G., Kamal, S. Akash M.S.H. Role of heavy metals in metabolic disorders // Endocrine disrupting chemicals-induced metabolic disorders and treatment strategies. Emerging contaminants and associated treatment technologies. Ed: Akash M.S.H. et al. Cham: Springer, 2021.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-45923-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-45923-9_13)
- Isidori M., Lavorgna M., Nardelli A., Parrella A. Toxicity on crustaceans and endocrine disrupting activity on *Saccharomyces cerevisiae* of eight alkylphenols // Chemosphere. 2006. V. 64. 1. P. 135–143.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.10.047>
- Killen S.S., Marras S., Metcalfe N.B., McKenzie D.J., Domenici P. Environmental stressors alter relationships between physiology and behaviour // Trends in Ecology & Evolution. 2013. V. 28. 11. P. 651–658.  
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.05.005>
- Kuz'mina V.V., Komov V.T., Tarleva A.F., Sheptitskiy V. Effect of dietary metal exposure on the locomotor reactions and food consumption in common carp *Cyprinus carpio* (L.) // Inland Water Biology. 2019. V. 12. P. 356–364.  
<https://doi.org/10.1134/S1995082919030106>
- Lalonde B., Garron C. Nonylphenol, octylphenol, and nonylphenol ethoxylates dissemination in the Canadian freshwater environment // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2021. V. 80. 2. P. 319–330.  
<https://doi.org/10.1007/s00244-020-00807-x>
- Li X.Y., Wei F., Gao J.S., Wang H.Y., Zhang Y.H. Oxidative stress and hepatotoxicity of *Rana chensinensis* exposed to low doses of octylphenol // Environ. Toxicol. Pharmacol. 2018 V. 64. P. 86–93.  
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.09.011>
- Liu R., Zhang Y., Gao J., Li X. Effects of octylphenol exposure on the lipid metabolism and microbiome of the intestinal tract of *Rana chensinensis* tadpole by RNAseq and 16s amplicon sequencing // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2020. V. 197. 110650.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110650>
- Mejjide F.J., Vázquez G.R., Piazza Y.G., Babay P.A., Itria R.F., Nostro F.L.L. Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol and 4-tert-octylphenol on early life stages of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus* // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2016. V. 124. P. 82–90.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.10.004>
- Miyagawa S., Sato T., Iguchi T. Subchapter 129B—Octylphenol // Handbook of Hormones. Ed: Ando H., Ukena K., Nagata S. Cambridge: Academic Press, 2021. P. 1001–1002.

- Moldogazieva N.T., Mokhosoev I.M., Mel'nikova T.I., Zavadskiy S.P., Kuz'menko A.N., Terentiev A.A.* Dual character of reactive oxygen, nitrogen, and halogen species: Endogenous sources, interconversions and neutralization. *Biochemistry (Moscow)*. 2020. V. 85. 1. P. 56–78. <https://doi.org/10.1134/S0006297920140047>
- Murphy M.* Review article. How mitochondria produce reactive oxygen species // *The Biochemical journal*. 2009. V. 417. P. 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Nwizugbo K.C., Ogwu M.C., Eriyamremu G.E., Ahana C.M.* Alterations in energy metabolism, total protein, uric and nucleic acids in African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus* Burchell) exposed to crude oil and fractions // *Chemosphere*. 2023. V. 316. 137778. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.137778>
- Prasad G.S., Rout S.K., Malik M.M., Karmakar S., Amin A., Ahmad I.* Occurrence of xenoestrogen alkylphenols (Octylphenols and Nonylphenol) and its impact on the aquatic ecosystem // *Xenobiotics in aquatic animals*. Ed: Rather M.A., Amin A., Hajam Y.A., Jamwal A., Ahmad I. Singapore: Springer, 2023. [https://doi.org/10.1007/978-981-99-1214-8\\_13](https://doi.org/10.1007/978-981-99-1214-8_13)
- Rey Vázquez G., Meijide F.J., Da Cuña R.H., Lo Nostro F.L., Piazza Y.G., Babay P.A., Trudeau V.L., Maggese M.C., Guerrero G.A.* Exposure to waterborne 4-tert-octylphenol induces vitellogenin synthesis and disrupts testis morphology in the South American freshwater fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes) // *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2009. V. 150. 2. P. 298–306. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.05.012>
- Sokolova I.* Bioenergetics in environmental adaptation and stress tolerance of aquatic ectotherms: Linking physiology and ecology in a multi-stressor landscape // *J. Experim. Biol.* 2021. V. 224. jeb236802. <https://doi.org/10.1242/jeb.236802>
- Vanni M.J.* Nutrient cycling by animals in freshwater ecosystems // *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2002. V. 33. P. 341–370. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150519>
- Weidinger A., Kozlov A.V.* Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: Oxidative stress versus signal transduction // *Biomolecules*. 2015. V. 5. P. 472–484. <https://doi.org/10.3390/biom5020472>
- White C.R., Alton L.A., Bywater C.L., Lombardi E.J., Marshall D.J.* Metabolic scaling is the product of life-history optimization // *Science*. 2022. V. 377. P. 834–839. <https://doi.org/10.1126/science.abm7649>
- Zaytseva T.B., Medvedeva N.G.* Molecular mechanisms of the response to 4-tert-Octylphenol-induced stress in a cyanobacterium *Planktothrix agardhii* // *Microbiology*. 2019. V. 88. P. 416–422. <https://doi.org/10.1134/S0026261719040143>

## Metabolic characteristics of the amphipod *Gammarus oceanicus* (Crustacea: Amphipoda) exposed to octylphenol (4-T-OP)

N. A. Berezina<sup>1, #</sup>, Yu. I. Gubelit<sup>1</sup>, L. G. Bakina<sup>2</sup>, A. V. Egorova<sup>2</sup>, S. V. Kholodkevich<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, Universitetskaya embankment. 1, St. Petersburg, 199034 Russia

<sup>2</sup>St. Petersburg Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences,

<sup>1</sup>4th Line V.O., 39, St. Petersburg, 199178 Russia

<sup>#</sup>e-mail: nadezhda.berezina@zin.ru

The growing impact of human activities on the biosphere requires research into the effects of exposure to hazardous toxic substances on aquatic ecosystems. Ecophysiological parameters of the amphipod *Gammarus oceanicus* Segerstråle, 1947, such as rates of food consumption, oxygen consumption and phosphate excretion (excreted in the body's urine), were studied in order to determine the responses of these crustaceans to the influence of a little-studied micropollutant of anthropogenic origin, xenoestrogen, 4-tert-octylphenol (4t-OP). After 28 days of exposure to the lowest concentrations of 4t-OP (0.25 µg/l), a decrease in the feeding and excretory activity of crustaceans was detected, and the level of oxygen consumption was similar to the values in control individuals. All studied parameters of the tested animals changed significantly after the same time of exposure to 2.5 µg/l 4t-OP, showing an adverse effect on the functioning of the crustacean organism. The data obtained can be used to develop criteria for the quality control of the aquatic environment.

**Keywords:** food consumption rate, respiratory activity, oxygen consumption rate, phosphate excretion rate, adaptive capabilities, xenoestrogens

УДК 578.832.1:578.432:598.252.1

## МНОГОЛЕТНЯЯ ДИНАМИКА ВИРУСОВ ГРИППА А ПТИЦ В ПОПУЛЯЦИЯХ КРЯКВЫ (*ANAS PLATYRHYNCHOS*) МОСКВЫ И МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ: ЗАВИСИМОСТЬ ОТ МИГРАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ

© 2024 г. А. А. Трещалина\*, Е. Ф. Родина\*, А. С. Гамбарян\*, Е. Ю. Боравлева\*,  
К. В. Авилова\*\*, С. П. Харитонов\*\*\*, @, К. Е. Литвин\*\*\*

\*Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова,  
РАН, Москва, 108819 Россия

\*\*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,  
Москва, 119234 Россия

\*\*\*Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН,  
Москва, 117312 Россия  
@e-mail: serpkh@gmail.com

Поступила в редакцию 04.03.2024 г.

После доработки 31.05.2024 г.

Принята к публикации 31.05.2024 г.

Целью данного исследования является выявление биологического разнообразия вирусов гриппа птиц на московских прудах и соотнесение изменения вирусологической картины с особенностями миграции крякв и динамикой численности уток этого вида на водоемах Москвы, попытка объяснения изменений в составе и разнообразии штаммов. В сентябре – ноябре 2008–2023 гг. на берегах городских прудов Москвы и Московской области собирали фекалии кряквы и изолировали из них вирусы гриппа типа А, к которым относятся и вирусы гриппа птиц. Вирусы выделяли стандартным способом путем размножения в куриных эмбрионах. Далее субтипировали изоляты путем ПЦР со специфическими праймерами и проводили секвенирование вирусов гриппа А. В течение 2008–2013 гг. в пробах от крякв преобладали европейские штаммы вирусов, в 2014–2019 гг. – азиатские. Соотнесение этих результатов с изменением миграционной картины у крякв позволяет считать, что европейские штаммы заносились в Московскую область преимущественно из южной Европы, а азиатские стали заноситься из Западной Европы. За исследованный период 2008–2019 гг. наблюдалось снижение числа штаммов вирусов гриппа, выделяемых от крякв на московских прудах. После 2014 года уменьшилась частота и резко упало разнообразие выделяемых вирусов. Причин снижения разнообразия штаммов может быть несколько, в частности – изменение соотношения добытых птиц на весенней и осенней охоте, увеличение численности крякв на зимовках в местах гнездования, а также падение численности озерных чаек, которые тоже являются носителями вирусов гриппа птиц.

**Ключевые слова:** кряква, *Anas platyrhynchos*, грипп птиц, миграции, Московская область

**DOI:** 10.31857/S1026347024060146, **EDN:** ujmlbu

Природным резервуаром вируса гриппа А (Articulavirales: *Orthomyxoviridae*, *Alphainfluenzavirus*) являются водоплавающие и околоводные птицы, в первую очередь – утиные. В ходе долгой совместной эволюции со своими хозяевами вирусы приспособились хорошо размножаться, не причиняя вреда инфицированной птице (Webster *et al.*, 1992). В птицах вирусы гриппа А размножаются в эпителиальных клетках нижнего отдела кишечника, вызывают бессимптомную инфекцию и передаются фекально-оральным путем (Olsen *et al.*, 2006). Более знакомые людям вирусы гриппа А, такие как вирусы гриппа

человека, свиней и высокопатогенный грипп кур, являются боковыми тупиковыми эволюционными ветвями, обычно сохраняющимися не более нескольких десятилетий. Однако все эти ветви берут начало из общего источника – пула непатогенных вирусов гриппа водоплавающих диких птиц.

Водоплавающим птицам принадлежит основная роль в поддержании циркуляции вирусов гриппа птиц в природных биоценозах. Кряквы (*Anas platyrhynchos*) являются одним из основных переносчиков этой инфекции. Осенью, во время осеннего перелета, отмечается наибольшее разнообразие

вирусов гриппа у водоплавающих птиц (Munster, Fouchier, 2009; Wille *et al.*, 2018, 2022). Исследования, проведенные на острове Эланд в Швеции, показали, что уровень заражения диких крякв достигает 25% от всех мигрирующих уток этого вида (Latorre-Margalef *et al.*, 2009; Latorre-Margalef, устное сообщение). Во время перелета дикие птицы могут контактировать с домашними и стать источниками инфекций для синантропных видов птиц и млекопитающих. При переходе к новому хозяину может возрасти патогенность вируса. Вирусы гриппа А, адаптированные к курам, вызывают массовые вспышки как в природе, так и в птицеводческих хозяйствах и наносят огромный экономический ущерб промышленному и домашнему птицеводству (Webster *et al.*, 1992; Львов и др., 2008; Шелканов и др., 2018). Помимо птиц, потенциальными хозяевами вирусов гриппа А являются свиньи, лошади и люди (Atanasova *et al.*, 2007; Hofer, 2022). В Великобритании и Китае были случаи заражения человека штаммами H5N1 и H5N6, а в Китае и Камбодже отмечено 15 случаев заражения людей штаммом H9N2 (<http://www.flu.org.cn/en/article-18367.html>). Эпидемиологический надзор за вирусами в дикой природе и в населенных пунктах необходим для поддержания состояния готовности к новым пандемиям.

Городские пруды Москвы и Подмосковья во время осеннего пролета птиц являются местом крупных скоплений кряквы. Они смешиваются с гнездившимися в городе птицами и, вероятно, обмениваются с ними вирусами. Вирусы гриппа А в фекалиях крякв при прохладной погоде могут оставаться живыми неделями и иногда месяцами, а при зимних температурах — в течение всей зимы. Начиная с 2006 года мы проводим мониторинг слабопатогенных вирусов гриппа птиц (LPAI) на Московских прудах. После 2014 года мы отметили изменения в картине состава выделяемых вирусов. Вирусы стали выделяться реже, и упало разнообразие.

По ходу данного исследования стало видно, что с годами изменились пропорции различных штаммов гриппа птиц. В частности, произошел занос нового штамма, тем не менее это не виделось как единственная причина изменения вирусологической картины. В связи с этим решено было попробовать выяснить: не может ли изменение вирусологической картины быть связано с особенностями миграции крякв.

Целью данного исследования являются выявление биологического разнообразия вирусов гриппа птиц на московских прудах, соотнесение изменения вирусологической картины с особенностями миграции крякв и характером зимовки этих уток на водоемах Москвы и попытка таким образом объяснить изменения в составе и разнообразии штаммов. На основании анализа геномов исследовали пути распространения вирусов в дикой природе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Сбор вирусологических проб*

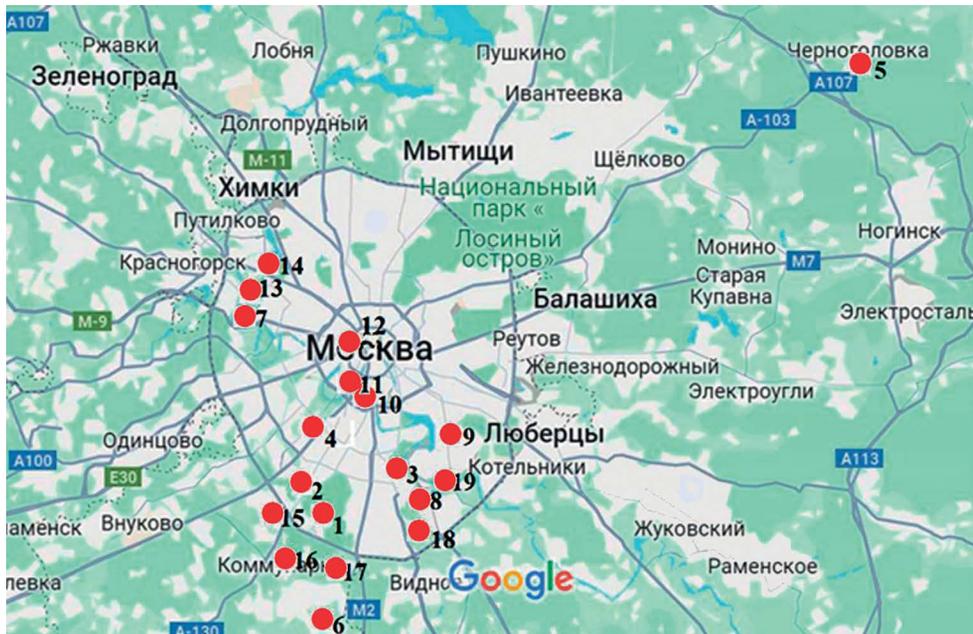
В осенние месяцы 2008–2023 гг. на берегах городских прудов Москвы и области собирали фекалии кряквы и изолировали из них слабопатогенные вирусы гриппа птиц (Боравлева и др., 2012; рис. 1).

### *Выделение вирусов*

Фекалии крякв суспендировали в двойном объеме фосфатно-солевого буфера (ФСБ) с добавлением антибиотиков: 0.4 мг/мл гентамицина, 0.1 мг/мл канамицина, 0.01 мг/мл нистатина и 2% раствора МусоKill АВ (РАА Laboratories GmbH). Суспензию центрифугировали 10 мин при 4 000 об/мин и полученным супернатантом (200 мкл) заражали 10-дневные куриные эмбрионы (КЭ). Аллантаиновую жидкость собирали через 48 ч. Пробы, положительные в реакции гемагглютинации, тестировали в иммуноферментном анализе со смесью антисывороток к вирусам гриппа А разных субтипов. Эти реакции надежно дифференцировали вирусы гриппа А и парамиксовирусы. Далее субтипировали изоляты путем ПЦР со специфическими праймерами и проводили секвенирование вирусов гриппа А (Heydarov *et al.*, 2017; Postnikova *et al.*, 2021; Stech *et al.*, 2008). Все изоляты хранятся в коллекции «Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Москва, Россия). Было собрано около 3646 образцов, из которых выделили 67 штаммов вирусов гриппа. Результаты секвенирования и филогенетический анализ штаммов описаны ранее в работе (Treshchalina *et al.*, 2022).

### *Учеты зимующих крякв в Москве и области*

Ежегодные учеты зимующих водоплавающих птиц в Москве в границах МКАД с 1985 по 2024 гг. проводили силами орнитологов и волонтеров в один день в третье воскресенье января. В каждом учете участвовали одновременно до 80 человек. Учетами охватывали все незамерзающие водоемы города. Было заложено около сорока маршрутов, которые проходили по всем основным местам, где скапливаются зимующие утки: это малые реки, полыньи и незамерзающие участки нижнего течения Москвы-реки, водосбросы плотин, некоторые пруды и водоемы-охладители ТЭЦ. Подсчитывали видовой состав и количество зимующих птиц на Москве-реке и на внутренних водоемах, число самцов и самок. Для учета птиц в больших скоплениях применяли метод фотофиксации. Собранные данные



**Рис. 1.** Места сбора вирусологических проб: 1 – Тропаревский пруд, ландшафтный заказник 55.637005 с.ш., 37.493396 в.д.); 2 – Большой Воронинский пруд, ул. Акад. Бакулева, Теплый Стан (55.643507, 37.484431); 3 – Зюзинская улица (55.666614, 37.577957); 4 – Удальцовские пруды (55.676724, 37.513398); 5 – оз. Южное, Черноголовка (56.001225, 38.386598); 6 – Ватутинки (55.501543, 37.299613); 7 – оз. Бездонное, Серебряный бор (55.778055, 37.427654); 8 – Люблино (55.646767, 37.728469); 9 – Кузьминские пруды, природно-исторический парк Кузьминки (55.692643, 37.777158); 10 – парк им. М. Горького (55.729686, 37.601101); 11 – парковый пруд, усадьба Трубецких (55.727280, 37.577336); 12 – Патриаршие пруды (55.763793, 37.592216); 13 – Большой Строгинский затон (55.798318, 37.430507); 14 – Ивановские пруды, парк Покровское-Стрешнево (55.819318, 37.480975); 15 – Мосрентген (55.615881, 37.473957); 16 – пруд Школьный, Коммунарка (55.571580, 37.479497); 17 – Южное Бутово (55.531552° 37.506919); 18 – Царицынские пруды, Природно-исторический парк Царицыно (55.627776, 37.686130); 19 – Братеево (55.630818, 37.722266).

объединяли в единый массив, который служил базой для анализа динамики численности видов и популяций (Авилова, 2023). В Московской области учеты проводили только на незамерзающем русле Москвы-реки. В данном сообщении использованы результаты за 2005–2021 гг.

#### *Анализ пространственных характеристик миграции крякв*

Для описания миграции крякв использовались данные по возвратам колец из базы данных Научно-информационного Центра кольцевания птиц ИПЭЭ РАН. Рассмотрен период 2005–2023 гг. Выбор 2005 г. как первого года анализа связана с тем, что проблема гриппа птиц в нашей стране существует с 2005 г. (Львов и др., 2008). Поскольку работа по сбору проб проводилась в Москве и Московской области, рассматриваются только миграции уток с тех зимовок, откуда кряквы, судя по данным кольцевания, попадают в сезон размножения в Московскую область, то есть с европейских зимовок и зимовок Причерноморья и юга Европейской России (Kharitonov *et al.*, 2024).

Всего по указанным регионам для 2005–2023 гг. в базе данных имеется 583 возврата крякв. Поскольку большинство крякв попадают в Московскую область с европейских зимовок, в большинстве анализов использованы данные именно по этим зимовкам, то есть по кряквам, окольцованным западнее 30° в.д.: таковых возвратов за указанный период было 408. Возвраты обрабатывались как картографически при помощи программы MapInfo различных версий, так и статистически при помощи различных программ: 1) для выяснения достоверности различия мест кольцевания и мест встреч крякв в разные года использовался метод пространственной статистики – тест Мардиа (Mardia, 1967) с коррекцией Робсона (Robson, 1968), компьютерная программа для этого теста написана Джеймсом Хайнсом в 1987 г. и скорректирована С.П. Харитоновым в 1998 году (Hines, Kharitonov, 1998); 2) факторный анализ возвратов колец проводился в программе Statistica-10, StatSoft Corp.; 3) для сравнения выборочных долей применялся критерий Стюдента с поправкой на неодинаковость выборок.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Встречаемость различных штаммов вирусов гриппа птиц**

Географическое происхождение московских вирусов. Юго-Восточная Азия и Северо-Западная Европа являются двумя зонами активной циркуляции вирусов гриппа птиц. Для рассмотрения происхождения вирусов, выделенных в Москве, сначала уточним используемые в статье географические границы Европы и Азии. Границу между Европой и Азией определяем согласно Большой Российской Энциклопедии: по Уралу, Кумо-Манычской впадине и Керченскому проливу (Романова и др. 2004). Мы также придерживаемся этого разделения (Kharitonov *et al.*, 2024).

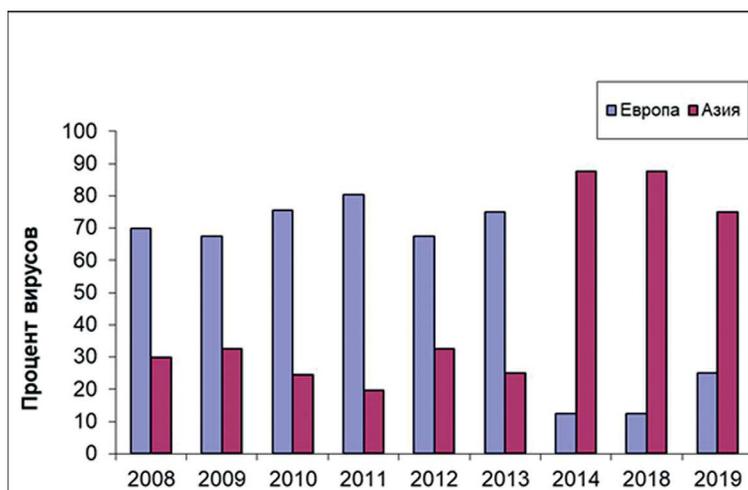
Гены вирусов гриппа, выделенных от московских крякв, относятся как к европейским эволюционным линиям, так и к азиатским. Так как благодаря непрерывной реассортации геном вирусов гриппа диких птиц очень неустойчив, оценку географического происхождения проводили для каждого гена независимо. Например, у изолята duck/Moscow/3806/2009 для генов PB2 и PB1 близкородственные гены обнаруживались у азиатских вирусов, а для других генов — у европейских вирусов. Можно заключить, что штамм duck/Moscow/3806/2009 появился в результате реассортации при одновременном заражении утки двумя вирусами: европейским и азиатским.

До 2013 года московские изоляты в основном относились к европейским эволюционным линиям. После 2013 года количество вирусов европейского происхождения снижается, начинают доминировать вирусы исходно азиатских эволюционных линий (рис. 2). Это связано с тем, что вирусы исходно

азиатских эволюционных линий начинают циркулировать в Европе и вытесняют европейские линии (Treshchalina *et al.*, 2022).

Для уточнения территорий, откуда попадают вирусы в Москву, мы исследовали географию обнаружения вирусов гриппа, близкородственных Московским изолятам. Для этого мы собрали в базе данных геномов вирусов гриппа (the Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID) (Shu *et al.*, 2017) все вирусы, имеющие процент нуклеотидных отличий менее 1% для генов PB2, PB1, PA, HA, NP и NA в сравнении с московскими изолятами, идентифицировали места выделения этих вирусов и подсчитали число вирусов из разных регионов (табл. 1).

Больше всего близкородственных вирусов обнаруживалось в Нидерландах и Швеции. С другой стороны, ряд вирусов близок к монгольским и китайским изолятам. После 2014 г. число близкородственных вирусов из Азии, которое и раньше было невысоким, практически не изменилось. В то же время число близкородственных вирусов из Европы значительно снижается с 2014 г. До 2014 г. московские изоляты по всем генам были близкородственными большому количеству штаммов Европы и Кавказа, т.е. между ними и Москвой происходил активный обмен вирусами гриппа. Так как вирусы перемещаются только вместе со своим хозяином, то отслеживание территорий, где выделялись ближайшие родственники московских вирусов, говорит о путях перемещения уток, инфицированных этими вирусами. Зараженные утки выделяют вирус в воду в течение одной-двух недель, но в водоеме вирус сохраняется живым до следующего года. Весь путь осеннего пролета уток — это цепь водоемов, куда выделяется вирус и где происходит заражение,



**Рис. 2.** Динамика географического происхождения генов близкородственных вирусов, выделенным в Москве в 2008–2019 гг.

**Таблица 1.** Среднее количество близкородственных вирусов из Европы и Азии за 2006–2014 и 2015–2021 годы

Регион	период	Сегмент генома					
		PB2	PB1	PA	HA	NP	NA
Европа	2006–2014	3.61	3.15	4.48	3.67	6.15	4.55
	2015–2021	0.17	0.33	0.06	0.17	0.25	0.67
	<i>p</i> -value*	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.01
Азия	2006–2014	1.36	0.00	0.00	0.00	0.18	0.06
	2015–2021	0.00	0.08	0.17	0.00	0.25	0.17
	<i>p</i> -value*	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05

Примечание. \*Уровень значимости отличий рассчитан на основе t-критерия Стьюдента.

в первую очередь молодежи, так как практически все взрослые утки – иммунные (Webster *et al.*, 1992).

Если сузить набор анализируемых родственных вирусов и рассматривать только тех из них, которые имеют менее пяти нуклеотидных отличий на ген, то мы получим выборку штаммов, имеющих общего предка с московским изолятом в данном сезоне. Различия именно такого порядка мы наблюдали среди вирусов, выделенных в одном московском пруду в один сезон. Подобный анализ показал, что такие варианты вируса гриппа А в первую очередь обнаруживались в Нидерландах и Швеции, реже – в Бельгии, Италии, Грузии и Украине (Treshchalina *et al.*, 2022).

Динамика выделения вирусов по годам. Количество и состав выделяемых вирусов резко варьировал по годам (табл. 2). Так, с 2006 по 2015 год из 1846 собранных образцов выделили 40 генетических вариантов вирусов, в то время как с 2016 по 2023 год из 1800 образцов – только 10. До 2014 года в каждый сезон выделяли несколько субтипов вируса гриппа птиц, причем близкородственное совпадение по всем генам встречалось редко, а в 2015, 2018, 2019, 2021 и в 2022 годах выделили по 2–4 вируса, практически идентичных по всем генам (по 0–4 отличия на весь геном). То есть, наблюдалось снижение распространенности вирусов, и уменьшение разнообразия выделяемых вирусов.

До 2014 года в каждый сезон выделяли несколько субтипов вируса гриппа А птиц, причем близкородственное совпадение по всем генам встречалось редко, но после 2014 года картина изменилась. Вирусы стали выделяться реже, и еще резче упало разнообразие выделяемых вирусов (рис. 3).

#### **Численность зимующих крякв в Москве и области**

В России и во всей Европе все чаще утки переходят к оседлости, оставаясь зимовать на незамерзающих водоемах и кормиться за счет горожан, которые активно подкармливают зимующих крякв.

Таких мест с изменением климата и развитием городов становится все больше (Viksne *et al.*, 2010; Авилова, Полежанкина, 2023). Зимовки кряквы в городе приурочены к свободным ото льда прудам и рекам на рекреационных территориях и в других часто посещаемых людьми местах, где утки получают регулярную подкормку. В Москве ежегодно образуется более 30 незамерзающих акваторий, пригодных для зимовок водоплавающих птиц. Численность зимующих на водоемах города крякв обычно стабилизируется в ноябре и почти без изменений поддерживается до марта, когда кряквы начинают покидать город, за исключением птиц, гнездящихся в его границах. Зимой общая численность крякв росла в городе ( $r = 0.88$ ;  $P < 0,05$ ;  $N = 17$ ) с конца 1990-х гг. и к 2021 г. достигла 31.2 тысячи птиц, а численность на внутренних водных объектах (прудах и малых реках) – 22.0 тысяч,  $r = 0.82$ ;  $P < 0,05$ ;  $N = 17$ . На Москве-реке численность в городе незначимо росла, а в Московской области незначимо снижалась (табл. 3).

#### **Пространственное распределение возвратов колец от крякв, прилетающих в сезон размножения в Москву и Московскую область**

Поскольку в районах западнее Урала нет возвратов колец от крякв, окольцованных восточнее Урала, для рассмотрения пространственного распределения возвратов за период 2005–2023 гг. взяты возвраты от птиц, окольцованных западнее 60° в. д. При этом весь период рассмотрения логично разбить на четыре: 2005–2007 гг. – до начала массового сбора проб на московских водоемах, 2008–2013 гг. – период, когда доминировали европейские штаммы слабопатогенной формы вируса гриппа А (LPAI), 2014–2019 гг. – период, когда доминировали азиатские штаммы LPAI (рис. 2), 2020–2023 гг. – оставшийся до настоящего времени период, данные по которому здесь не приводятся, поскольку не было сбора проб в этот период, в частности из-за карантина по КОВИД-19, введенного в 2020 г.

**Таблица 2.** Выделение вирусов гриппа А из фекалий птиц, собранных на берегах прудов в Москве и Московской области

Год	№ вод.*	Число проб	Изол**	Ген.***	Субтипы ВГ
2006	1	15	1	1	H6N2 (1)
2008	1	193	4	4	H3N1 (2); H4N6 (1); H11N9 (1)
2009	1	151	5	5	H3N8 (1); H4N6 (3); H6N2 (1)
2010	1	441	7	7	H3N8 (3); H3N6 (1); H5N3 (2); H6N2 (1)
2011	1	360	15	>11	H3N8 (5); H3N2 (1); H4N6 (5); н.с.(4)
2011	2	25	0	0	
2012	2	79	2	1	H4N6 (2)
2012	3	120	5	5	H3N8 (2); H4N6 (3)
2013	1	126	3	3	H1N1 (1); H5N3 (2)
2013	15	4	0	0	
2014	1	86	1	1	H3N8 (1)
2014	2	60	0	0	
2015	1	190	4	2	H3N6 (4)
2016	1	115	0	0	
2018	1	90	0	0	
2018	2	290	2	1	H1N2 (2)
2018	17	14	0	0	
2019	1	180	2	1	H1N1 (2)
2019	4	39	1	1	H11N6 (1)
2019	2	80	0	0	
2019	13	42	0	0	
2019	16	12	0	0	
2019	18	10	0	0	
2021	1	114	1	1	H3N2 (1)
2021	5	98	2	1	H3N8 (2)
2022	1	98	1	1	
2022	5	290	5	2	
2022	7	37	4	1	H3N8 (4)
2022	3	6	0	0	
2022	14	12	0	0	
2022	9	33	0	0	
2022	19	21	0	0	
2022	8	15	0	0	
2022	10	13	0	0	
2022	12	27	0	0	
2023	6	36	2	1	H11Nx (2)
2023	1	58	0	0	
2023	2	43	0	0	
2023	5	3	0	0	
2023	11	24	0	0	

Примечание. № вод.\* – номер водоема (см. рис. 1). Изол\*\* – число изолятов вирусов гриппа. Ген.\*\*\* – число различающихся генотипов. Вирусы, близкородственные по всем генам, считаются за один.

Изменение картины миграций крякв в течение всего рассматриваемого периода (рис. 4). В 2005–2007 гг. и 2008–2013 гг., кроме большого числа возвратов из западной и восточной Европы имеется значительное число возвратов из южной

Европы (Испании, Италии и Греции). Для периода 2005–2007 гг. имеются четыре таких возврата – два из северной Италии, два – из восточной Греции (рис. 4а). Для периода 2008–2013 гг. имеется 11 таких возвратов: один из Португалии, 5 из южной

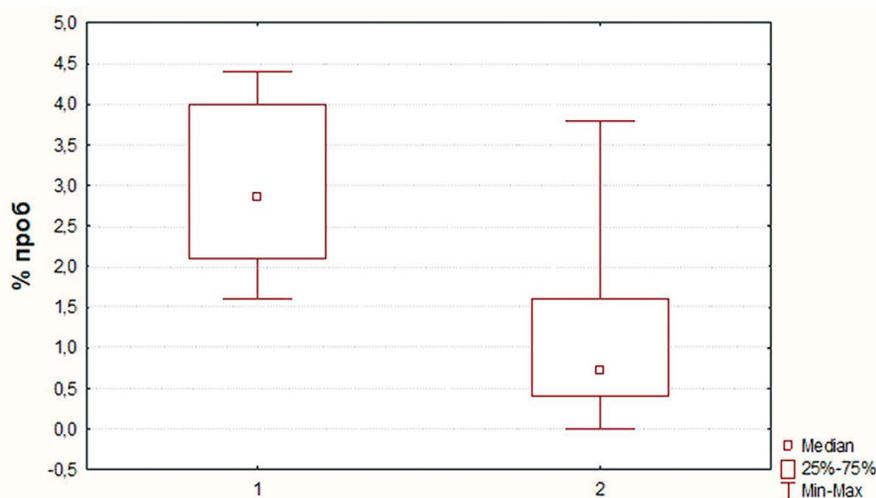


Рис. 3. Доля проб, содержащих вирус гриппа А, за 2008–2013 гг. (1) и за 2014–2021 гг. (2) в общей выборке,  $p < 0.05$ .

Италии и 5 из восточной Греции (рис. 4б). Кроме того, в период 2008–2013 гг. значительно восточнее Московской области охотниками получено два возврата с южной Украины и один возврат из Турции (рис. 4 В). В 2014–2019 гг. уже меньше возвратов из южной Европы (6 возвратов), фактически только два попадают непосредственно в Московскую область (рис. 4в). При этом становится больше возвратов с южной Украины, но все они попадают

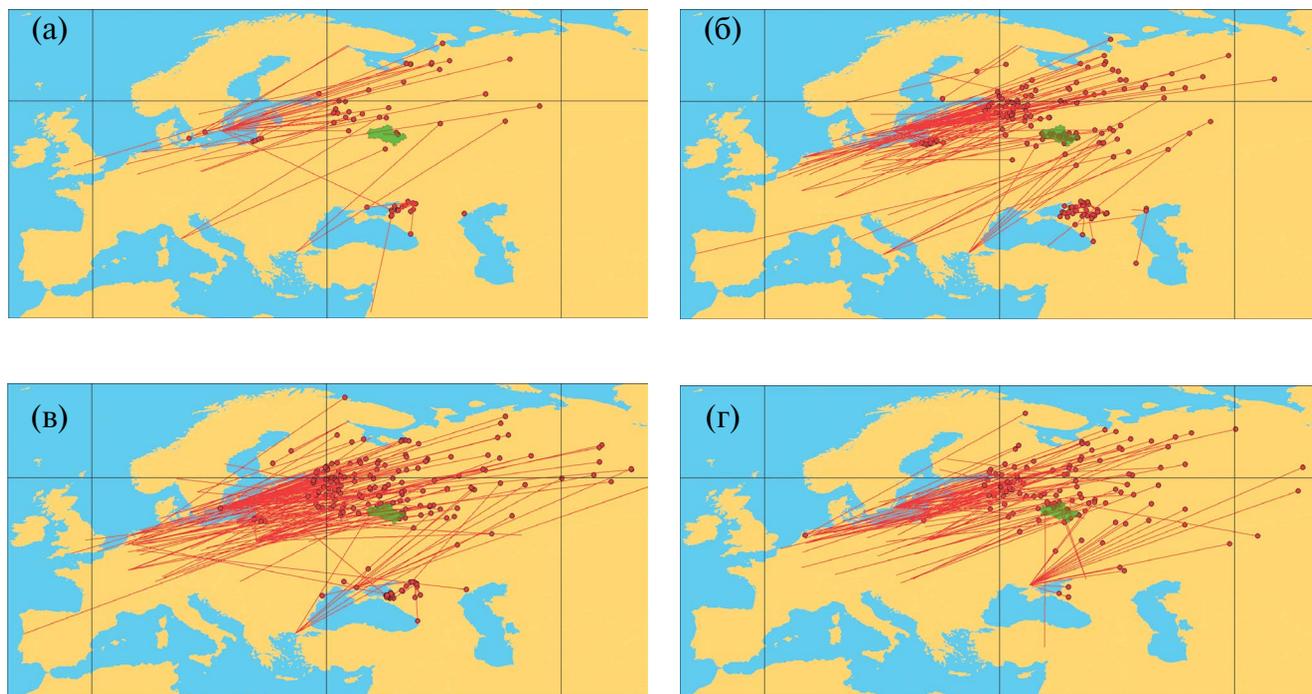
восточнее Московской области. В 2020–2023 гг. возвраты из южной Европы уже отсутствуют полностью, а возвраты с южной Украины, юга России и Турции уже достигают непосредственно Московской области (рис. 4г).

Таким образом, идет прогрессирующее изменение картины возвратов с годами (рис. 4). Чтобы убедиться, что это реальная тенденция, а не случайная картина, необходимо привести статистические

Таблица 3. Численность зимующих крякв в Москве в третье воскресенье января с 2005 по 2021 гг.

Год	Общая численность в Москве	Внутренние* водоемы г. Москвы	Москва-река, город Москва	Москва-река, Московская область**
2005	12823	8507	4316	1570
2006	10033	8447	1586	1050
2007	15373	10526	5117	1885
2008	20596	14150	6446	2950
2009	23382	17861	5521	3650
2010	23076	17701	5375	1800
2011	22250	17666	4584	2410
2012	17142	11435	5707	650
2013	21965	16525	5440	710
2014	24108	15483	8625	1570
2015	28122	21468	6654	1880
2016	29715	22705	7010	1630
2017	28803	23511	5292	1872
2018	27237	19859	7378	705
2019	28853	22962	5891	1738
2020	27640	18556	9084	2441
2021	31181	22026	9155	2513

Примечание \*Внутренние водоемы – малые реки и не замерзшие участки прудов. \*\* Данные В.А. Зубакина с соавторами (Зубакин и др., 2021 и личные сообщения).



**Рис. 4.** Распределение возвратов крякв, окольцованных западнее  $60^\circ$  в.д. а – 2005–2007 гг., б – 2008–2013 гг., в – 2014–2019 гг., г – 2020–2023 гг. Каждая красная линия обозначает один возврат кольца кряквы, линии начинаются в точке кольцевания птицы, оканчиваются красным кружком – местом встречи птицы. Многоугольник, залитый зеленым, – Московская область.

доказательства. Для этого мы ограничимся птицами, окольцованными в Европе за пределами России, рассматривать будем весь период до 2023 г., поскольку изменения картины миграций у крякв с Европейских зимовок происходили и после 2019 г.

Статистический анализ 408 возвратов от птиц, окольцованных в Европе за пределами России за период до 2023 г., показал достоверное или почти достоверное (по порогу  $P < 0.1$  и близко к  $P < 0.05$ ) смещение областей возвратов в России к северо-востоку произошло от 2011 к 2014 г. (табл. 4) Достоверное смещение областей европейских зимовок к северо-западу (“подтянулись за местами встреч”) от 2016 к 2019 гг. (табл. 4). Дистанция от места кольцевания до места встречи достоверно изменилась от 2014 ( $1794.4 \pm 151.4$  км,  $N = 19$ ) к 2015 ( $1390.6 \pm 132.3$  км,  $N = 25$ ) гг.;  $t = 2.008$ ,  $P = 0.0516$ . Достоверное изменение среднего азимута от места кольцевания по направлению к месту встречи произошло между 2011 ( $82.96^\circ \pm 7.55^\circ$ ,  $N = 21$ ) и 2012 ( $61.85^\circ \pm 5.17^\circ$ ,  $N = 19$ ) гг.;  $t = 2.305$ ,  $P = 0.0273$ .

На основании результатов вышеприведенного анализа можно предварительно заключить, что картина миграции крякв менялась в период 2011–2019 гг., и момент наблюдаемой смены штаммов гриппа птиц (от 2013 к 2014 гг.) с преимущественно европейских на преимущественно азиатские (рис. 2)

попадает в этот интервал. Поскольку результаты теста Мардиа (табл. 4) и сравнений дистанций и азимутов получились довольно разнородными, необходимо провести дополнительный факторный анализ.

Для проведения факторного анализа выбирали только независимые переменные, а также дистанцию и азимут, которые являются переменными, зависимыми от широты и долготы кольцевания и встречи, однако, выбранные для рассмотрения без переменных, обозначающих указанные координаты, могут играть роль независимых переменных, включающих в себя эти координаты (табл. 5).

Главный вывод из результатов факторного анализа: на картину возвратов сезонность не влияет, поскольку юлианская дата нигде не существенна, но влияет календарная дата, что фактически означает года кольцевания и встреч (что мы получили и при анализах по тесту Мардиа). Существенное влияние оказывает широта встречи и широта кольцевания, что существенно отражается также в величине дистанции и азимута.

Наконец, сравним долю возвратов птиц, окольцованных в южной Европе (южнее  $45^\circ$  широты), в общем количестве возвратов с европейских зимовок. За период 2005–2013 гг. имеется 15 возвратов из южной Европы из 160 полученных за эти годы возвратов, за 2014–2023 – 6 таких возвратов из 248.

**Таблица 4.** Результаты сравнения областей зимовок (места кольцевания) и областей гнездования и миграции в России (места встреч) в разные периоды по тесту Мардиа (приведены только случаи, когда имело место достоверная ( $P < 0.05$ ) или почти достоверная ( $P < 0.1$ ) разница между центрами рассматриваемых районов)

Сравниваемые области	Период (годы)	Число возвратов	Координаты центра района (широта, долгота)	Показатели достоверности
Области гнездования и миграции	2005–2011	118	58°58', 35°14'	$\chi^2 = 5.40, df = 2, P = 0.0672$
	2012–2023	290	59°26', 37°08'	
	2005–2012	137	58°55', 35°21'	$\chi^2 = 5.31, df = 2, P = 0.07$
	2013–2024	271	59°29', 37°13'	
	2005–2013	160	59°07', 35°33'	$\chi^2 = 5.54, df = 2, P = 0.0628$
	2014–2023	248	59°25', 37°16'	
Области зимовок	2005–2016	227	53°17', 15°09'	$\chi^2 = 6.18, df = 2, P = 0.0456$
	2017–2023	181	53°47', 14°43'	
	2005–2017	263	53°21', 14°57'	$\chi^2 = 9.42, df = 2, P = 0.009$
	2018–2023	145	53°47', 14°59'	
	2005–2018	285	53°21', 15°05'	$\chi^2 = 5.30, df = 2, P = 0.0707$
	2019–2023	123	53°52', 14°40'	

**Таблица 5.** Результаты факторного анализа возвратов (факторные нагрузки)

Использованные переменные	Первая главная компонента	Вторая главная компонента
Календарная дата кольцевания	<b>-0.921111</b>	-0.216962
Широта места кольцевания	0.001829	0.193771
Долгота места кольцевания	0.073732	-0.236059
Широта места встречи	-0.232650	<b>0.862046</b>
Долгота места встречи	-0.270845	0.653117
Календарная дата встречи	<b>-0.918740</b>	-0.211871
Юлианская дата кольцевания	0.246161	-0.296306
Широта места кольцевания	0.216905	<b>-0.876832</b>
Долгота места кольцевания	-0.173535	-0.396077
Широта места встречи	<b>0.883546</b>	-0.143412
Долгота места встречи	0.649814	0.486777
Юлианская дата встречи	-0.301574	-0.015890
Календарная дата кольцевания	<b>-0.935999</b>	0.145594
Дистанция от места кольцевания до места встречи	-0.173302	<b>-0.776137</b>
Азимут от места кольцевания по направлению к месту встречи	0.246572	<b>0.752688</b>
Календарная дата встречи	<b>-0.923859</b>	0.198971
Юлианская дата кольцевания	0.200625	0.654951
Дистанция от места кольцевания до места встречи	0.588438	-0.615543
Азимут от места кольцевания по направлению к месту встречи	<b>-0.822451</b>	0.033336
Юлианская дата встречи	-0.528897	0.488236

Примечание. Жирным шрифтом выделены существенные факторные нагрузки (в случае, если нагрузка больше 0.7).

Разница между долями по критерию Стьюдента для выборочных долей для неодинаковых выборок (Лакин, 1990) достоверна:  $t = 3.1044753, P = 0.002$ . За период 2005–2014 гг. имеется 18 возвратов из южной Европы из 178 полученных за эти годы

возвратов, за 2015–2023 – 3 таких возврата из 230. Разница также достоверна:  $t = 3.99, P = 0.0001$ . Результаты подтверждают полученное ранее: на рубеже 2013–2015 гг. произошло изменение картины миграций крякв: утки стали использовать зимовки,

расположенные к северо-западу от прежних, и стали прилетать на более северо-западные зимовки. Следует также подчеркнуть, что здесь нам важен сам факт изменения картины миграций, поскольку это ожидаемо связано с картиной изменения состава штаммов гриппа птиц, носимых кряквами.

В плане изменения картины миграций было бы полезно посмотреть динамику численности зимующих крякв в разных частях Европы. Однако, к сожалению, по крякве такие данные крайне скудны и мало чем могут помочь. По численности этого вида есть общая экспертная оценка для Европы: 1 600 000 особей, численность стабильна. В пределах этой общей стабильной численности отмечены некоторые изменения численности на зимовках, по данным учетов в Греции, Болгарии, Румынии и Албании доля крякв от общей их численности на зимовках в этих странах между 2009 и 2018 гг. сократилась с 3% до 1% ([wpp.wetlands.org/explore](http://wpp.wetlands.org/explore), Species Mallard *Anas platyrhynchos*). Подобные сведения вполне согласуются с полученным здесь результатом на основе данных кольцевания: кряквы постепенно уходят с зимовок южной Европы.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### *Вероятные причины смены состава штаммов с европейских на азиатские с 2014 г.*

В период 2005–2013 гг. в Московскую область с европейских зимовок летели кряквы преимущественно к юго-западу от нее, а в 2014–2023 гг. — преимущественно к северо-западу.

В 2008–2013 г. европейские штаммы вируса могли попадать в Московскую область преимущественно из южной Европы. Начиная с 2014 г. в пробах из Московской области стали доминировать азиатские штаммы гриппа птиц. Очевидно, были многократные заносы азиатских штаммов в Европу (Verhagen *et al.*, 2015; Marchenko *et al.*, 2015; Щелканов и др., 2016; Kharitonov, 2021). Если учесть вышеописанную картину изменения миграций крякв, то получается, что начиная с 2014 г. азиатские штаммы LPAIV попадают в Московскую область не из Азии, а с зимовок в западной Европе. Именно в западной Европе в последнее время стало много вирусов исходно азиатских эволюционных линий (табл. 1, Verhagen *et al.*, 2015; Postnikova *et al.*, 2021; Treshchalina *et al.*, 2022).

Кроме того, отмечено, что в последние годы в Московской области и ее окрестностях появляется все больше крякв с зимовок, расположенных в южном по отношению к Московской области направлении. Необходимо отметить, что, если эта тенденция реальна, в ближайшие годы можно ожидать нарастания в Московской области крякв

из южной Украины, Ставропольского и Краснодарского краев, южного Причерноморья вместе со специфичными для них штаммами вируса гриппа птиц.

### *Вероятные причины уменьшения разнообразия штаммов вирусов гриппа птиц с годами*

Соотношение весенних и осенних возвратов крякв вкуче с нарастанием численности на зимовках в Москве и области. Численность крякв на зимовках в городах, в частности в Москве, растет (Авилова, Полежанкина, 2023). Теоретически, прирост численности крякв должен увеличивать число контактов, что должно увеличивать разнообразие штаммов, но этого не происходит, а происходит наоборот. Кряквы стали меньше мигрировать, а значит, возможно, меньше контактировать с другими видами-переносчиками. Число других видов уток на зимовках тоже растет (Авилова, 2023).

Для того чтобы попытаться понять причины уменьшения разнообразия штаммов вирусов, необходимо сравнить отношение чисел весенних и осенних возвратов в рассматриваемые в данном сообщении периоды (табл. 6).

В период 2005–2023 доля крякв, добытых осенью, резко уменьшается, а весной возрастает. Если в 2005–2007 большая доля добывалась осенью, то в 2022–2023 — весной. При этом за тот же период разнообразие штаммов на московских прудах с годами уменьшается. При этом известно, что кряквы, зараженные даже LPAI, находятся в худшем физическом состоянии, чем незараженные особи (Latorge-Margalef *et al.*, 2009). Поскольку основные возвраты крякв — это добыча охотников, можно предположить, что может происходить все большее изъятие охотниками носителей гриппа весной.

Число возвратов крякв в 2019–2023 гг. меньше, чем в 2008–2018. Возможно, это свидетельствует о том, что в 2008–2018 годы осенью через Москву и область пролетало больше уток, чем в последующие годы. При этом с годами сильно возрастает число зимующих в Москве крякв (табл. 3). Это может говорить об уменьшающейся доле птиц, мигрирующих через Московскую область, что уменьшает контакты крякв с носителями гриппа птиц на зимовках. Такое положение, возможно, является еще одной причиной уменьшения разнообразия штаммов.

Возможное влияние снижения численности озерных чаек (*Larus ridibundus*) в Москве. Озерные чайки могут инфицироваться и разносить вирусы гриппа А (Arnal *et al.*, 2015). В период 2006–2024 численность озерных чаек, по данным зимних учетов, в Москве колеблется в пределах 15–130 особей и не имеет видимых тенденций изменения численности. Однако количество чаек, гнездящихся на московских водоемах, уменьшается (Зубакин, 2018). В 2000-е годы

**Таблица 6.** Соотношение возвратов крякв, добытых весной (до июня включительно) и осенью (от июля включительно и далее)

Годы	Число возвратов весной	Число возвратов осенью	Соотношение возвратов весна/осень
2005–2007	25	40	0.625
2008–2013	133	79	1.684
2014–2018	113	76	1.487
2019	29	11	2.636
2020	15	10	1.5
2021	27	13	2.077
2022–2023	54	13	4.154

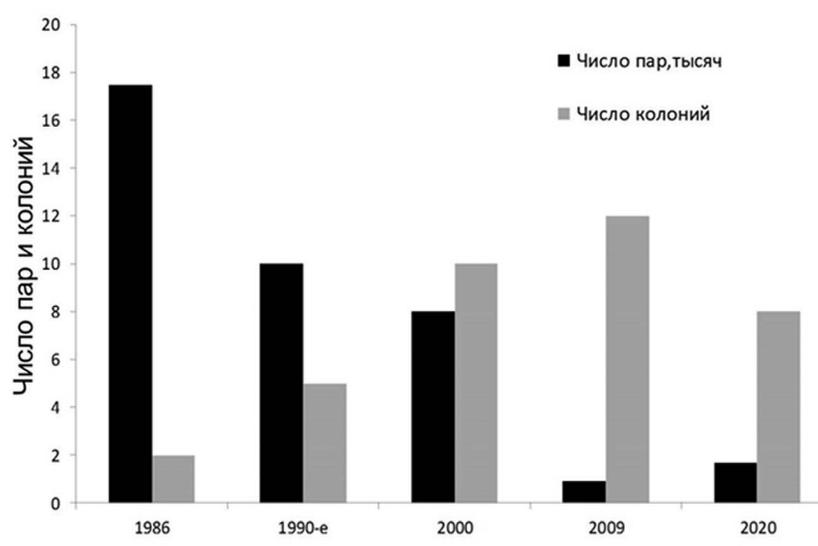
вокруг Москвы существовал ряд свалок бытового мусора, которые постепенно ликвидировались (Харитонов, 1983; Зубакин, 2018). В последние полтора десятилетия по мере ликвидации свалок общая численность озерных чаек в Москве резко сократилась, а число колоний увеличилось (рис. 5). Период падения численности озерных чаек совпадает с периодом падения разнообразия штаммов вирусов крякв, что позволяет предполагать причинно-следственную связь этих явлений. Колонии чаек, даже крупные, занимают небольшую площадь, основные контакты с утками, которые в колониях не гнездятся, происходят вне колоний. При падении численности плотность размещения чаек вне колонии, в том числе во внегнездовое время, тоже уменьшается, а с ней – и вероятность контактов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За период исследований (2006–2019 гг.) наблюдалось снижение числа штаммов вирусов гриппа,

выделяемых от крякв на московских прудах. После 2014 года уменьшилась частота и резко упало разнообразие выделяемых вирусов. Наметилась тенденция преобладания вирусов азиатского происхождения над европейскими, преобладавшими ранее. Причиной такой смены с большой долей вероятности стало изменение картины миграции крякв. В Московской области в этот период значительно уменьшилось число крякв, прибывающих с южно-европейских зимовок, но сохранилось число прибывающих с западноевропейских. На западноевропейские зимовки в весенне-летне-осенний сезон 2014 г. был занесен азиатский штамм гриппа H5N8, поэтому в дальнейшем они стали источником азиатских штаммов у крякв Московского региона.

Уменьшение разнообразия штаммов вируса после 2014 г. объяснить значительно труднее. Причин этого может быть несколько: 1) смещение основной добычи крякв охотниками с осени на весну и добывание инфицированных особей еще на весеннем пролете; 2) рост численности оседлых крякв, отказавшихся от сезонных миграций, отчего уменьшилось

**Рис. 5.** Примерная численность и структура населения озерных чаек в Москве за период 1986–2020 гг. с привлечением данных В.А. Зубакина, Г.С. Еремкина и И.М. Панфиловой (Авилова, 2022).

число их межпопуляционных контактов на европейских зимовках; 3) снижение численности гнездящихся озерных чаек, которые тоже являются резервуаром вируса гриппа птиц.

В последние годы в Московской области и ее окрестностях появляется все больше крякв с зимовок, расположенных в южном по отношению к Московской области направлении. Если эта тенденция продолжится, в ближайшие годы можно ожидать нарастания в Московской области числа крякв с зимовок, расположенных в южной Украине, Ставропольском и Краснодарском краях, южном Причерноморье, а может быть – и в восточном Средиземноморье, вместе со специфичными для них штаммами вируса гриппа птиц.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа поддержана стандартным институциональным финансированием. Не было использовано финансирования от внешних грантов.

## ЭТИЧЕСКОЕ ОДОБРЕНИЕ И СОГЛАСИЕ

Исследование проводилось в рамках общепринятых этических норм. Отловы и добыча животных для целей данного исследования не производились.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной публикации заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Авилова К. В. Структура и динамика численности городской популяции хохлатой чернети (*Aythya fuligula*, Anseriformes, Anatidae) в Москве // Зоол. журн. 2022. Т. 101. № 11. С. 1255–1267. DOI: 10.31857/S0044513422090033.
- Авилова К. В. Результаты многолетнего мониторинга видового состава и численности зимующих в Москве водоплавающих птиц // Мониторинг птиц в России. 2023. Т. 2. Ред. М. В. Калякин, О. В. Волцит. М.: Товарищество научных изданий КМК. С. 4–22.
- Авилова К. В., Полежанкина П. Г. Зимовки водоплавающих птиц в городах умеренного климатического пояса и определяющие их факторы // Докл. РАН. Науки о жизни. 2023. Т. 510. С. 273–277. DOI: 10.31857/S2686738922601060.
- Боравлева Е. Ю., Ломакина Н. Ф., Гамбарян А. С. Выделение вирусов гриппа А от птиц на водоемах Москвы // Казарка. Бюлл. Рабочей группы по гусеобразным Северной Евразии. 2012. № 15–2. С. 13–28.
- Зубакин В. А. Урбанизированная популяция озерных чаек города Москвы и ближнего Подмосковья: история и закономерности формирования пространственной структуры // Орнитология: история, традиции, проблемы и перспективы. Материалы Всероссийской конференции, посвященной 120-летию со дня рождения Г. П. Дементьева. М.: Товарищество научных изданий КМК. 2018. С. 169–175.
- Зубакин В. А., Шведко М. А., Еремкин Г. С., Антоновский Т. Р., Бащинская С. В., Бондарева Н. А., Бугаев В. В., Булатова Ю. В., Виноградова Н. Г., Воронцов Д. А., Голышев Д. С., Губина Л. Н., Давыдов Д. В., Данилина Т. И., Диментова Е. А., Жеглов А. А., Жеглова П. А., Иванов А. И., Ивановский К. В., Карашук О. А., Конюхов Н. Б., Краснова Е. Д., Кулыгина Н. К., Лалак У. В., Логинов Ф. В., Макарова Е. Ю., Мардашова М. В., Мелихова Е. В., Морковин А. А., Никонорова М. Е., Новиков О. В., Пахлеванова М. Б., Сапункова Н. Ю., Скачков С. А., Шамин М. С., Шамина К. Ю., Абрамичева П., Авдеев В. П., Боголюбов А. С., Борзенко А. В., Брохович Е. Н., Буйволов Ю. А., Григорьева Н. А., Дворянникова Д., Дуляков А. В., Зайцева С. В., Зоз М. Ю., Иванова М. В., Киенко В., Клочков К. Н., Кудрявцева Е. И., Ледечев П. В., Ляпнева О. В., Марченко Е. А., Новикова А. Г., Орлова Е. Ю., Поповкина А. Б., Ройзман Н. Е., Савишкина Ю. С., Сапронова А. А., Сомова И. В., Сонин С. В., Сосновская О., Степанова В. В., Тиунов Н. А., Тиунова М. В., Третьякова И. С., Турская Т. Б. Результаты учета водоплавающих и околоводных птиц на реках Москве и Оке в столице и Подмосковье в зимний сезон 2020/2021 г. // Московка. Новости программы “Птицы Москвы и Подмосковья”, 2021. вып. 33. С. 9–33.
- Лакин Г. Ф. Биометрия. 1990. М.: Высшая школа, 352 с.
- Львов Д. К., Щелканов М. Ю., Прилипов А. Г., Дерябин П. Г., Федякина И. Т., Галкина И. В., Киреев Д. Е., Фролов А. В., Аканина Д. С., Усачева О. В., Шляпкина О. В., Поглазов А. Б., Морозова Т. Н., Прошина Е. С., Гребенникова Т. В., Забережный А. Д., Яковлев С. С., Щербакова Л. О., Шаповалов А. В., Жалин М. В., Руденко В. П., Пичуев А. Е., Литвин К. Е., Варкентин А. В., Стешенко В. В., Харитонов С. П., Самохвалов Е. И., Альховский С. В., Алипер Т. И., Мартыновченко В. В., Лысенко С. Н., Власов Н. А., Непоклонов Е. А. Расшифровка эпизоотической вспышки среди диких и домашних птиц на юге европейской части России в декабре 2007 г. // Вопросы вирусологии. 2008. Т. 53. № 4. С. 18–23.
- Романова Э. П., Никишин А. М., Тишков А. А., Мартынова М. Ю. Европа // Большая российская энциклопедия: 2004–2017. [в 35 т.] / гл. ред. Ю. С. Осипов. – М.: Большая российская энциклопедия, 2004–2017. <https://old.bigenc.ru/geography/text/4025468>.

- Харитонов С. П. Индивидуальное использование мест кормежки озерными чайками (*Larus ridibundus*) // Зоол. Журн. 1983. Т. 62. № 5. С. 748–754.
- Щелканов М. Ю., Кириллов И. М., Шестопалов А. М., Литвин К. Е., Дерябин П. Г., Львов Д. К. Эволюция вируса гриппа А/Н5N1 (1996–2016) // Вопросы Вирусологии. 2016. Т. 61 № 6. С. 245–256. DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-6-245-256.
- Щелканов М. Ю., Кириллов И. М., Литвин К. Е., Шестопалов А. М., Харитонов С. П., Федякина И. Т., Галкина И. В., Дерябин П. Г., Львов Д. К. Двадцать лет спустя: история распространения гриппа А/Н5 в популяциях птиц (1996–2017 гг.) // Первый Всероссийский Орнитологический Конгресс. 29 января – 4 февраля 2018 г. г. Тверь, Россия. Тезисы докладов. ISBN978-5-9907592-5-1. Тверь: ТГУ, С. 357–358.
- Arnal A., Vittecoq M., Pearce-Duvel J., Gauthier-Clerc M., Boulinier T., Jourdain E. Laridae: a neglected reservoir that could play a major role in avian influenza virus epidemiological dynamics // Crit. Rev. Microbiol. 2015. V. 41. P. 508–519. HAL Id: hal-00935832.
- Atanasova K., A. De Vleeschauwer, F. Barb, K. Van Reeth. Detailed Pathogenesis of Swine Influenza Virus in the Natural Host // Options for the Control of Influenza VI, Toronto, Ontario Canada. 2007. Abstract O96.
- Heydarov R. N., Lomakina N. F., Boravleva E. Yu., Kholodilov I. S., Gambaryan A. S., Mikhailovich V. M., Fesenko E. E. The use of microarrays for the identification of the origin of genes of avian influenza viruses in wild birds // MIR J, 4(1), 21–30. Microbiology Independent Research Journal. 2017. V. 4 № 1. P. 21–30. DOI: 10.18527/2500-2236-2017-4-1-21-30.
- Hines J. E., Kharitonov S. P. Компьютерная программа “Тест Мардия”, исполняемый файл – big-cent.exe. 1998. Patuxent Wildlife Research Center – Bird Ringing Centre of Russia.
- Hofer U. Equine flu after the jump // Nat Rev Microbiol. Mar; V. 20. № 3. P. 126. doi: 10.1038/s41579-022-00688-y. PMID: 35027703.
- Kharitonov S. P. Wigeon migration and probable avian flu ways (how it looks from data of the Bird Ringing Centre of Russia) // Research Gate. Presentation. 2021. 37 p. DOI: 10.13140/RG.2.2.11584.30725.
- Kharitonov S. P., Kharitonova I. A., Litvin K. E. Migration Atlas of European species of palearctic Anatidae with the population outline (from the data of the Bird Ringing Centre of Russia). 2024. 522 p. // [http://ring-center.ru/Migration\\_Atlas.pdf](http://ring-center.ru/Migration_Atlas.pdf).
- Latorre-Margalef N., Gunnarsson G., Munster V. J., Fouchier R. A. M., Osterhaus A. D. M. E., Elmberg J., Olsen B., Wallensten A., Fransson T., Brudin L., Waldenström J. Does Influenza A affect body condition of wild mallard ducks, or vice versa? A reply to Flint & Franson. Proceedings of the Royal Society of London // Biological Sciences. 2009. № 276 (1666). P. 2347–2349. DOI: 10.1098/rspb.2009.0275.
- Marchenko V. Y., Susloparov I. M., Kolosova N. P., Goncharova N. I., Shipovalov A. I., Durymanov A. G., Ilyicheva T. N., Budatsirenova L. V., Ivanova V. K., Ignatyev G. A., Ershova S. N., Tulyahova V. S., Mikheev V. N., Ryzhikov A. B. Influenza A (H5N8) virus isolation in Russia, 2014 // Archives of Virology. 2015. V. 160. № 11. P. 2857–2860. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-30-35.
- Mardia K. V. A non-parametric test for the bivariate two-sample location problem. J. ROY. STAT. SOC., SER. B. 1967. V. 29. P. 320–342.
- Munster V. J., Fouchier R. A. Avian influenza virus: of virus and bird ecology // Vaccine. 2009 Oct 23; V. 27(45). P. 6340–6344. Epub 2009 Mar 9. PMID: 19840670. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.02.082
- Olsen B., Munster V. J., Wallensten A., Waldenström J., Osterhaus A. D., Fouchier R. A. Global patterns of influenza a virus in wild birds // Science. 2006. V. 312 № 5772. P. 384–388. DOI: 10.1126/science.1122438.
- Postnikova Y., Treshchalina A., Boravleva E., Gambaryan A., Ishmukhametov A., Matrosovich M., Fouchier R. A. M., Sadykova G., Prilipov A., Lomakina N. Diversity and Reassortment Rate of Influenza A Viruses in Wild Ducks and Gulls // Viruses. 2021. May 27; V. 13(6). P. 1010. PMID: 34072256; PMCID: PMC8230314. DOI: 10.3390/v13061010
- Robson D. S. The effect of ties on critical values of some two-sample rank tests // BIOMETRICS UNIT, CORNELL UNIV. 1968. BU-258-M. 4 p.
- Stech J., Stech O., Herwig A., Altmepfen H., Hundt J., Gohrbandt S., Kreibich A., Weber S., Klenk H. D., Mettenleiter T. C. Rapid and reliable universal cloning of influenza A virus genes by target-primed plasmid amplification // Nucleic Acids Res. 2008. Dec; V. 36(21). E139. Epub 2008 Oct 2. PMID: 18832366; PMCID: PMC2588516. doi: 10.1093/nar/gkn646
- Treshchalina A., Postnikova Y., Gambaryan A., Ishmukhametov A., Prilipov A., Sadykova G., Lomakina N., Boravleva E. Monitoring of Avian Influenza Viruses and Paramyxoviruses in Ponds of Moscow and the Moscow Region // Viruses. 2022. Nov 24; V. 14(12). P. 2624. PMID: 36560628; PMCID: PMC9781285. DOI: 10.3390/v14122624
- Verhagen J. H., Jeugd van der H. P., Nolet B. A., Sialerus R., Kharitonov S. P., Vres de P. P., Vuong O., Majoor F., Kuiken T., Fouchier R. A. Wild bird surveillance around outbreaks of highly pathogenic avian influenza A (H5N8) virus in The Netherlands, 2014, within the context of global flyways // Eurosurveillance, 2015. V. 20. I. 12, 26 March 2015. P. 21–32. DOI: 10.2807/1560-7917.es2015.20.12.21069.
- Viksne J., Svazas S., Czajkowski A., Janaus M., Mischenko A., Kozulin A., Kuresoo A., Serebryakov V. Atlas of Duck population In Eastern Europe. 2010. Vilnius: “Akstis”. 199 p.
- Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M., Kawakita Y. Evolution and ecology of influenza A viruses // Microbiological Reviews. 1992. V. 56. № 1. P. 152–179.

Wille M., Latorre-Margalef N., Tolf C., Halpin R., Wentworth D., Fouchier R.A. M., Raghvani J., Pybus O.G., Olsen B., Waldenström J. Where do all the subtypes go? Temporal dynamics of H8–H12 influenza A viruses in waterfowl // *Virus Evolution*. 2018. V. 4 № 2. vey025. P. 1–12. DOI: 10.1093/ve/vey025.

Wille M., Tolf C., Latorre-Margalef N., Fouchier R.A. M., Halpin R.A., Wentworth D.E., Raghvani J., Pybus O.G., Olsen B., Waldenström J. Evolutionary features of a prolific subtype of avian influenza A virus in European waterfowl // *Virus evolution*. 2022. V. 8. № 2. P. 1–11. DOI: 10.1093/ve/veac074.

## **Long-term dynamics in different avian influenza viruses in mallard (*Anas platyrhynchos*) population in Moscow City and region: dependence on the migration activity**

**A. A. Treshchalina<sup>1</sup>, E. F. Rodina<sup>1</sup>, A. S. Gambaryan<sup>1</sup>, E. Yu. Boravleva<sup>1</sup>,  
K. V. Avilova<sup>2</sup>, S. P. Kharitonov<sup>3, \*</sup>, K. E. Litvin<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Chumakov Federal Scientific Center for the Research and Development of Immune-and-Biological Products,  
108819, Moscow, Russia*

<sup>2</sup>*Biological Faculty of the M.V. Lomonosov Moscow State University, 119234, Moscow, Russia*

<sup>3</sup>*A.N. Severtsov Institute of ecology and evolution RAS, 117312, Moscow, Russia*

*\*e-mail: serpkh@gmail.com*

The purpose of this study is revealing of the avian influenza virus diversity at the Moscow waterbodies and comparison of the virology changing pattern to the Mallard's migratory features and wintering capacities at the Moscow waterbodies, as well as an attempt to explain shifting in the virus strain contents and diversity. Mallard droppings were collected in the autumn of 2008–2023 from shores of Moscow and Moscow Region waterbodies. Avian influenza viruses from the feces were extracted. The extraction process was the standard one with the virus breeding on the chicken embryos. After breeding the extracted viruses were treated by PCR together with specific primaries and then sequences of the type A viruses were obtained. In 2008–2013 European virus strains were prevalent in the Mallard samples, whereas in 2014–2019 the prevalence shifted to the Asian strains. Comparison of these results to the changing of Mallard migration features allow suggesting that European strains were entered into the Moscow Region mainly from the southern Europe. The Asian strains were entered from the Western Europe, since 2014 this part of Europe really became a focus of the Asian strains. For the study period of 2008–2019 in the Mallard feces extractions from the Moscow waterbodies we observed decreasing of the virus strain numbers. The frequency and the diversity of extracted viruses decreased sharply after 2014. There could be several causes for the decreasing of the strain diversity, in particular this is changing in proportions of hunted ducks during spring and autumn hunting, increasing Mallard numbers on winter grounds within the breeding range, as well as, declining numbers in Black-headed Gulls that are a frequent carrier of the avian influenza.

*Keywords:* Mallard, avian influenza, migration, Moscow Region