

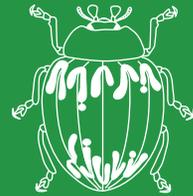
ISSN 0042-1324

Том 143, Номер 2

Март - Апрель 2023



УСПЕХИ СОВРЕМЕННОЙ БИОЛОГИИ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 143, номер 2, 2023

| | |
|--|-----|
| Несинонимичные однонуклеотидные замены и инделы: вклад в молекулярный постгеномный портрет клеточной линии НерG2 <i>Е. В. Поверенная, О. И. Киселева, В. А. Арзуманян, М. А. Пятницкий, И. В. Вахрушев, Е. А. Пономаренко</i> | 107 |
| Роль гаптоглобина в защите организма от токсического действия внеклеточного гемоглобина <i>М. Г. Голубева</i> | 114 |
| Стереотаксическое исследование функций головного мозга: альтернативные подходы <i>С. В. Альбертин</i> | 123 |
| Быстрая оценка показателей сердечно-сосудистой системы с помощью кардиореспираторных индексов <i>Ек. Н. Мокашева, Ев. Н. Мокашева, И. В. Гребенникова, В. А. Земскова, В. И. Болотских</i> | 131 |
| Этологические основы взаимоотношений человека и карликовых свиней-компаньонов <i>Н. А. Быстрова</i> | 138 |
| Изменчивость гена цитохрома <i>b</i> мтДНК полевки-экономки (<i>Alexandromys oeconotus</i> Pallas, 1776) северо-восточной Азии и Аляски <i>В. В. Переверзева, Н. Е. Докучаев, А. А. Примак, Е. А. Дубинин</i> | 149 |
| Эффекты воздействия водорастворимых форм фуллеренов и их производных на метаболизм растений и урожайность сельскохозяйственных культур <i>О. В. Ямскова, Д. В. Курилов, И. В. Заварзин, М. С. Краснов, Т. В. Воронкова</i> | 165 |
| Некоторые методологические подходы к выявлению жароустойчивых генотипов культурных растений (на примере хлебных злаков) <i>Н. Н. Круглова, А. Е. Зинатуллина</i> | 180 |
| Правила для авторов | 192 |

Contents

Vol. 143, No. 2, 2023

| | |
|---|-----|
| Non-Synonymous Single-Nucleotide Mutations and Indels: Contribution to the Molecular Postgenome Portrait of the HepG2 Cell Line <i>E. V. Poverennaya, O. I. Kiseleva, V. A. Arzumanyan, M. V. Pyatnitskiy, I. V. Vakhrushev, E. A. Ponomarenko</i> | 107 |
| Role of Haptoglobin in Protecting the Toxic Effects of Hemoglobin in Various Pathologies <i>M. G. Golubeva</i> | 114 |
| Stereotaxic Method of Brain Loci Localization: The Alternative Approaches <i>S. V. Albertin</i> | 123 |
| Rapid Assessment of Cardiovascular System Parameters Using Cardiorespiratory Indices <i>Ek. N. Mokasheva, Ev. N. Mokasheva, I. V. Grebennikova, V. A. Zemskova, V. I. Bolotskikh</i> | 131 |
| Ethological Basis for the Relationship between Humans and Miniature Pigs <i>N. A. Bystrova</i> | 138 |
| Variability of the Gene Cytochrome <i>b</i> mtDNA of the Tundra Vole (<i>Alexandromys oeconomus</i> Pallas, 1776) in North-Eastern Asia and Alaska <i>V. V. Pereverzeva, N. E. Dokuchaev, A. A. Primak, E. A. Dubinin</i> | 149 |
| Effects of the Impact of Water-Soluble Forms of Fullerenes and Their Derivatives on Plants Metabolism and Yield of Agricultural Crops <i>O. V. Yamskova, D. V. Kurilov, I. V. Zavarzin, M. S. Krasnov, T. V. Voronkova</i> | 165 |
| Some Methodological Approaches to the Identification of Heat Resistant Genotypes of Cultivated Plants (on the Example of Cereals) <i>N. N. Kruglova, A. E. Zinatullina</i> | 180 |
| Rules for authors | 192 |

УДК 577.1:57.088

НЕСИНОНИМИЧНЫЕ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЕ ЗАМЕНЫ И ИНДЕЛЫ: ВКЛАД В МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПОСТГЕНОМНЫЙ ПОРТРЕТ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ НерG2

© 2023 г. Е. В. Поверенная¹ *, О. И. Киселева¹, В. А. Арзуманян¹,
М. А. Пятницкий¹, И. В. Вахрушев¹, Е. А. Пономаренко¹

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

*e-mail: k.poverennaya@gmail.com

Поступила в редакцию 09.12.2022 г.

После доработки 09.12.2022 г.

Принята к публикации 29.12.2022 г.

В геноцентричном режиме проведен сравнительный анализ результатов геномного, транскриптомного и протеомного профилирования образцов клеточной линии НерG2. Показана прослеживаемость на транскриптомном и протеомном уровнях изменений, связанных с наличием несинонимичных однонуклеотидных замен и инделов в геноме. На транскриптомном уровне регистрируется большинство молекулярных событий, вызванных абберациями на геномном уровне. В то же время лишь единичные протеоформы могут быть детектированы из числа кодируемых выбранными мутантными генами. Вероятно, это связано с методическими ограничениями протеомных методов, не позволяющих регистрировать протеоформы, присутствующие в образце в низких концентрациях. Результаты исследования согласуются с ранее полученными данными других научных групп и описывают принципиальные методические решения, требуемые для расшифровки молекулярного постгеномного портрета биологических образцов с разрешением на уровне абберантных молекул.

Ключевые слова: мутации, геном, транскриптом, протеом, протеоформы, молекулярное профилирование

DOI: 10.31857/S0042132423020096, **EDN:** KMZWKK

ВВЕДЕНИЕ

Реализация генетической информации в каждом органе, ткани и клетке живых организмов зависит от конкретной роли, направленной на обеспечение функционирования целостного организма. Для человека известно около 20 тыс. белок-кодирующих генов (Ensembl release 94), что в несколько раз меньше первоначальных оценок, которые были сделаны на старте международного проекта “Геном человека” (Venter et al., 2001; Smith, Kelleher, 2013). В каждом типе ткани экспрессируется в среднем 50–60% всего генома (GTEx Consortium, 2015), при этом количество вариантов белковых продуктов (протеоформ), кодируемых одним геном, может достигать 100 (Ponomarenko et al., 2016; Aebersold et al., 2018). Многообразие протеоформ обуславливает протеомную гетерогенность.

Основные источники протеомной гетерогенности – несинонимичные однонуклеотидные замены, альтернативный сплайсинг и посттрансляционные модификации. Каждый вариант белка (протеоформа) может иметь отличную от других функцию, участвуя в различных биологических процессах (Poverennaya et al., 2020). Показано, что

из 65 тыс. несинонимичных полиморфизмов, найденных в геноме человека, более 30% являются причиной возникновения белков с измененными функциями (Yip et al., 2008). Следовательно, изменение или нарушение функции только одного белка может приводить к перестройке взаимосвязей между различными уровнями (транскриптомным, протеомным, метаболомным) реализации генетической информации, меняя молекулярный постгеномный портрет.

Развитие технологий молекулярного анализа в направлении высокопроизводительного секвенирования и масс-спектрометрии привело к накоплению существенных массивов данных, что, в свою очередь, способствовало углублению знаний о возможностях реализации генома. Полученные в ходе таких исследований наборы данных используют для системного изучения и последующего мультиомного моделирования (Vitrinel et al., 2019) взаимосвязей между различными омик-слоями – геномным, транскриптомным, транслятомным, протеомным. Выявленные механизмы эпигенетической регуляции экспрессии, механизмы регуляции экспрессии гена на уровне трансля-

ции, связи между уровнем транскрипта и белка (Edfors et al., 2016) – сложные, не позволяющие описать процессы реализации генетической информации линейными закономерностями, например простой зависимостью между количеством мРНК и соответствующего белка в клетке (Tenzer et al., 2016; Poverennaya et al., 2017). Ключевой фактор для корректного моделирования биологических процессов – коэффициент переноса/потерь информации между различными слоями реализации генетической информации и, в итоге, конечным фенотипическим проявлением.

В данной работе изучен вопрос о последовательной реализации мутаций (несинонимичных однонуклеотидных замен и инделов) на примере клеточной линии HepG2 (Arzumanyan et al., 2021).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеточной линии HepG2

Клеточная линия HepG2 (гепатобластома человека, SCC249) была приобретена у Merck KGaA, Deutschland. После оттаивания клетки культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 100 ед./мл пенициллина/стрептомицина (все от Gibco, USA) в CO₂-инкубаторе в стандартных условиях (5% CO₂, 37°C, влажность 100%). Для подготовки образцов клетки отделяли 0.25%-ным раствором трипсин-ЭДТА (ПанЭко, Россия), трижды промывали PBS и подсчитывали в камере Горяева. Все используемые операции и реагенты были максимально унифицированы для каждого образца нестационарной клеточной линии, чтобы свести к минимуму возможные технические ошибки.

Полногеномное секвенирование

ДНК выделяли с помощью набора PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo FS, USA), согласно протоколу производителя. В финальной концентрации ДНК 100 нг в объеме 50 мкл была подготовлена библиотека с использованием TruSeq Nano DNA Library Prep Kit (Illumina, USA). Контроль концентрации полученной библиотеки осуществляли с помощью набора Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo FS, USA) на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, USA). Секвенирование было произведено на приборе NovaSeq 6000 (Illumina, USA) с длиной прочтения 2 × 150 п.о. Качество геномных данных проверяли с помощью программы FastQC (Trivedi et al., 2014). Для обработки результатов секвенирования использовали фреймворк bcbio-nextgen (<https://github.com/bcbio/bcbio-nextgen>). Анализ данных выполнялся в соответствии с рекомендациями GATK best practices от Broad Inst., USA.

Поиск несинонимичных однонуклеотидных замен и инделов проводили относительно рефе-

ренсного генома (Ensembl v103) в GATK Haplotype-Caller (van der Auwera et al., 2013), как для геномных данных. Полученные генетические варианты аннотировались с помощью программы Jannovar; их также искали в каталоге Cancer Gene Census (<https://cancer.sanger.ac.uk/census>).

Собранные данные депонированы в SRA NCBI, номер проекта PRJNA765908.

Транскриптомное секвенирование

РНК выделяли с помощью набора PureLink RNA Mini Kit (Thermo FS, USA), согласно протоколу производителя. В финальной концентрации РНК 10 нг в объеме 50 мкл была подготовлена кДНК-библиотека с использованием TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina, USA). Контроль концентрации полученной библиотеки осуществляли с помощью набора Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo FS, USA) на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, USA). Секвенирование было произведено на приборе NovaSeq 6000 (Illumina, USA) с длиной прочтения 2 × 100 п.о. Качество геномных данных проверяли с помощью программы FastQC. Для обработки результатов секвенирования использовали фреймворк bcbio-nextgen (<https://github.com/bcbio/bcbio-nextgen>). Анализ данных выполнялся в соответствии с рекомендациями GATK best practices от Broad Inst., USA.

Поиск несинонимичных однонуклеотидных замен и инделов проводили относительно референсного генома (Ensembl v103) в GATK HaplotypeCaller (van der Auwera et al., 2013), как для геномных данных. Полученные генетические варианты аннотировались с помощью программы Jannovar; их также искали в каталоге Cancer Gene Census (<https://cancer.sanger.ac.uk/census>).

Собранные данные депонированы в SRA NCBI, номер проекта PRJNA765908. Детальное описание опубликовано в статье (Pyatnitskiy et al., 2021).

Масс-спектрометрия

Белковая фракция из предварительно алкилированного и восстановленного лизата клеток линии HepG2 была гидролизирована на пептиды модифицированной протеазой трипсина (Thermo FS, USA). Далее был выполнен хромато-масс-спектрометрический анализ в панорамном режиме в трех технических повторениях. Хроматографическое разделение пептидов проводили с помощью хроматографа Ultimate 3000 RSLC Nano system (Thermo FS, USA). Масс-спектрометрический анализ выполняли с помощью масс-спектрометра сверхвысокого разрешения Orbitrap Fusion (Thermo FS, USA). Полученные файлы масс-спектров были проанализированы с помощью пакета SearchGUI (версия 4.0.5) с использованием трех поисковых алгоритмов (X!Tandem, MS-GF+ и OMSSA)

(Kiseleva et al., 2018). В качестве референсной базы аминокислотных последовательностей белков, по которой производили биоинформатический поиск, использовали библиотеку, созданную на основе белковых сиквенсов человека из репозитория SwissProt (v.2022_01) с добавлением оригинальных последовательностей с аминокислотными заменами, идентифицированными на транскриптомном уровне, а также белков-контаминантов из базы cRAP (Mellacheruvu et al., 2013). Белок считали идентифицированным, если удавалось детектировать не менее двух протеотипических пептидов длиной 9–26 аминокислотных остатков. Отсечение по ложноположительным идентификациям как для пептидов, так и для белков и для совпадающих пар теоретического и экспериментального спектров установлено на уровне 1%.

Полученные протеомные данные доступны в Mendeley Data (<https://data.mendeley.com/>).

Опубликованные данные

Данные полногеномного секвенирования с аналогичными параметрами секвенирования исследуемого образца клеток HepG2 (технология Illumina, парноконцевое прочтение с длиной рида 100 п.о., покрытие не менее 90X) выгружены из SRA NCBI (идентификаторы SRR14832808, SRR5296491).

Данные транскриптомного секвенирования с аналогичными параметрами секвенирования исследуемого образца клеток HepG2 (технология Illumina, парноконцевое прочтение с длиной рида 150 п.о., с суммарным количеством ридов не менее 30 млн ридов) выгружены из SRA NCBI SRR17514594 (PRJNA795717), SRR10011494 (PRJNA561411), SRR12132985 (PRJNA643657).

Биоинформатическая обработка полученных данных проводилась в соответствии с анализом данных секвенирования исследуемого образца.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прогресс развития высокопроизводительных омикс-технологий способствовал расширению знаний о возможностях реализации генома. Мета-анализ данных зачастую приводит к противоречивым результатам, которые связаны не только с различием технологических платформ, на которых были выполнены исследования, но и с изначальной гетерогенностью образцов. В 2019 г. на примере широкомасштабного профилирования образцов клеточной линии HeLa, предоставленных 13 лабораториями, было показано наличие нескольких молекулярных и фенотипических профилей этих клеток (Liu et al., 2019), что изменило представление о клеточных линиях как о стабильных конструктах. Следовательно, для оценки стабильности путей реализации генетической информации необходим комплексный анализ результатов мультиметного (геномного, транскриптомного и протеомного) профилирования конкретного образца.

тиомного (геномного, транскриптомного и протеомного) профилирования конкретного образца.

На примере клеток HepG2 (аликвоты получены в максимально унифицированных условиях одновременно из одного образца клеточной линии) проведен полногеномный, транскриптомный и протеомный анализ для оценки гетерогенности соответствующих молекулярных профилей с учетом реализации мутаций (несинонимичных однонуклеотидных замен (nsSNP) и инделов). Для создания молекулярного портрета гетерогенности омикс-слоев полученные результаты сопоставлены с опубликованными ранее результатами профилирования клеточной линии HepG2.

Поиск генетических вариантов по данным полногеномного секвенирования

В результате полногеномного секвенирования (WGS, whole genome sequencing) клеток HepG2 найдено 11674 генетических варианта, из которых 11186 вариантов относились к классу несинонимичных однонуклеотидных замен и 488 вариантов являлись инделами. Найденные nsSNP были распределены по 5858 генам. Из них в 1961 гене встречались только гомозиготные генетические варианты (92 индела, 2694 однонуклеотидные замены), в 3155 генах встречались только гетерозиготные генетические варианты (237 инделов, 4841 однонуклеотидная замена). Из 5858 генов для 187 генов известна их роль в онкогенезе, согласно каталогу Cancer Gene Census. При этом в 55 генах встречались только гомозиготные генетические варианты, в 103 генах – только гетерозиготные.

Поиск генетических вариантов по данным РНК-секвенирования

По данным РНК-секвенирования (RNASeq) клеточной линии HepG2 выявлено 13 тыс. экспрессирующихся генов, для которых детектированы 1781 мутация, включая 1633 однонуклеотидные замены и 148 инделов.

Найденные несинонимичные генетические варианты распределены по 1296 генам. Из них в 340 генах встречались только гомозиготные генетические варианты (12 инделов, 394 однонуклеотидные замены), в 880 генах встречались только гетерозиготные генетические варианты (119 инделов, 1018 однонуклеотидных замен). Из 1296 генов для 56 генов известна их роль в развитии онкогенеза, согласно каталогу Cancer Gene Census. В 14 генах встречались только гомозиготные, а в 36 генах – только гетерозиготные генетические варианты.

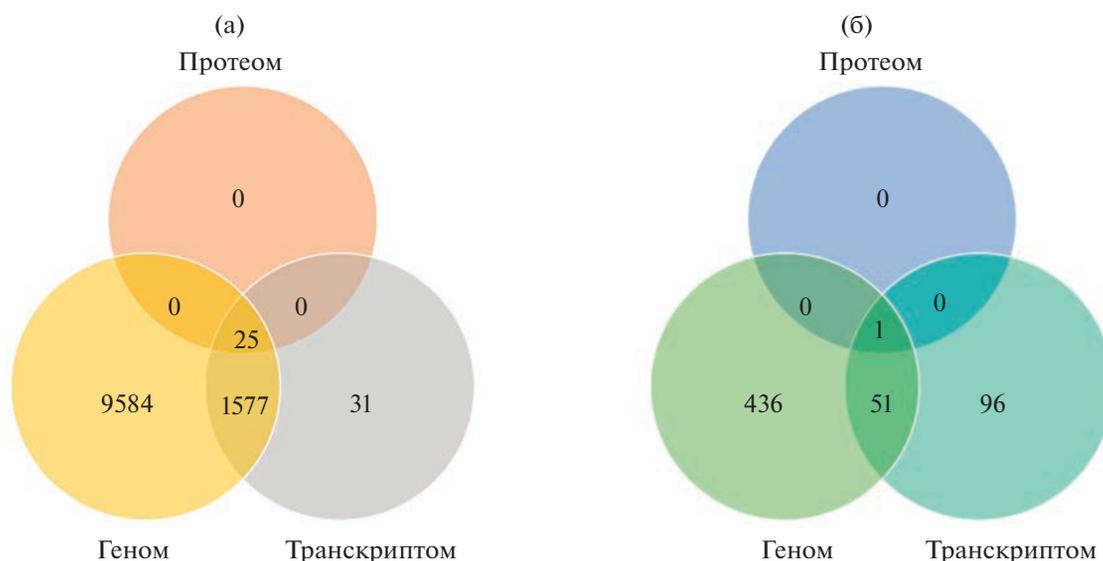


Рис. 1. Выявленные несинонимичные однонуклеотидные замены (а) и инделсы (б) по результатам полногеномного, транскриптомного и протеомного профилирования опухолевой клеточной линии HepG2.

Пересечение результатов поиска генетических вариантов согласно полногеномным и транскриптомным данным

Мы сопоставили 11 674 генетических варианта, обнаруженных в результате полногеномного секвенирования, и 1781 генетический вариант, найденный в результате секвенирования транскриптома. Сопоставление проводили для каждого типа отдельно – для однонуклеотидных замен и для инделсов.

На рис. 1 представлена диаграмма Венна для nsSNP. Как следует из данных, 98% вариантов, найденных по данным RNASeq, подтверждены по данным WGS. Из общих 1602 вариантов 1128 являются гетерозиготами и 474 представляют собой гомозиготы. Из 31 варианта, детектированного только через RNASeq, 23 – условные гетерозиготы и 8 – условные гомозиготы. Также из этих 31 варианта наиболее распространены замены С→Т, G→А и Т→С (каждая замена в 6 вариантах). Интересно отметить, что первые два типа замен могут быть объяснены феноменом РНК-редактирования. Остальные замены встречались только 4 раза (G→С) и реже.

Далее мы анализировали пересечение инделсов. Как и следовало ожидать, сплайсирование РНК существенно осложняет работу алгоритмов поиска инделсов, делая качество поиска последних существенно ниже, по сравнению с исследованием однонуклеотидных замен. Из всех 148 инделсов, найденных с помощью RNASeq, только 35% подтверждены данными WGS.

Пересечение результатов поиска генетических вариантов согласно полногеномным, транскриптомным и протеомным данным

В результате протеомного масс-спектрометрического профилирования клеток HepG2 при сопоставлении со стандартной библиотекой канонических и сплайс-опосредованных белковых последовательностей (UniProt) надежно детектировано 1236 белковых продуктов, кодируемых 1206 генами человека. Помимо канонических белковых продуктов, удалось обнаружить пять сплайс-опосредованных вариантов (P35613-2, P17096-2, Q00325-2, P29692-3, O94925-3, Q70UQ0-4). При использовании кастомизированной библиотеки, созданной на основании результатов транскриптомного секвенирования (TPM > 0.01), из 25 141 последовательности, кодируемой 13 681 геном, выявлены 1407 белковых последовательностей, кодируемых 1363 генами.

На протеомном уровне идентифицировано 25 несинонимичных однонуклеотидных замен, из которых на геномном уровне 18 представлены гомозиготами, а 7 – гетерозиготами, а также один индел. Надо отметить, что, несмотря на выполнение критериев достоверности при панорамном масс-спектрометрическом анализе, обнаруженные мутации требуют дополнительной валидации в таргетном режиме.

Анализ опубликованных результатов молекулярного профилирования

Для оценки стабильности генома клеточной линии HepG2 полученные данные о разнообразии мутации и экспрессии транскриптов сопоставлены с опубликованными результатами дру-

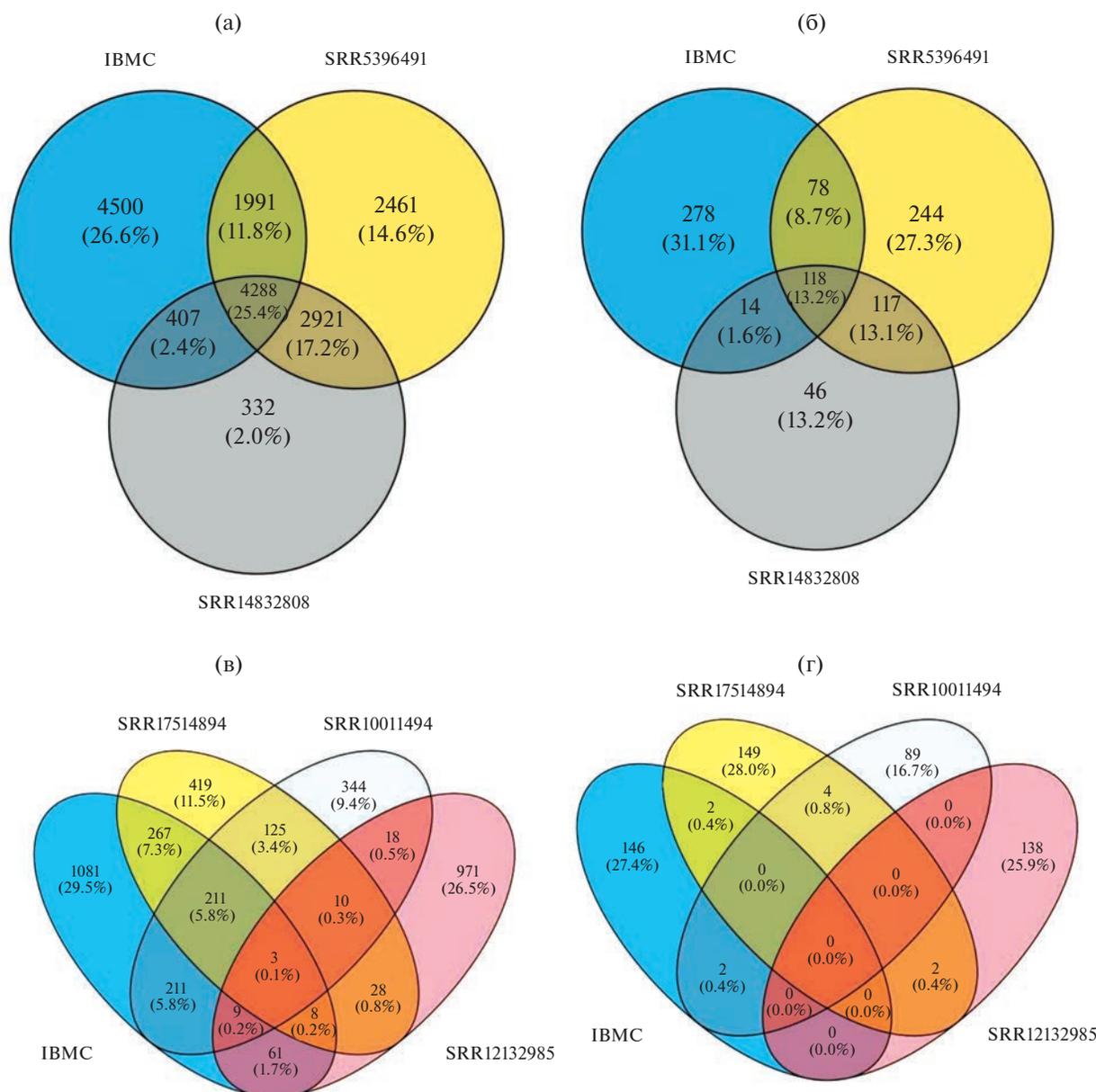


Рис. 2. Диаграмма Венна, отражающая пересечение между наборами данных секвенирования нуклеотидных последовательностей клеточной линии HepG2 (публичные источники). (а) – геномный уровень, точечные нуклеотидные замены; (б) – геномный уровень, инделы; (в) – транскриптомный уровень, точечные нуклеотидные замены; (г) – транскриптомный уровень, инделы. IBMC – данные, полученные в настоящем исследовании. SRR... – данные, полученные в результате экспериментов других научных групп, депонированные в базе SRA NCBI.

гих научных групп. Результаты протеомного анализа позволяют получить существенно меньшее покрытие белок-кодирующих генов, в сравнении с результатами секвенирования. Это объясняется, с одной стороны, ограничениями по чувствительности протеомных аналитических методов (Vavilov et al., 2022), а с другой – тем, что не все протеотипические пептиды могут быть детектированы вследствие физико-химических особенностей, и стандартные подходы для выявления белков с мутациями не всегда являются информативными.

В результате анализа полногеномных данных выявлено суммарно 17805 мутаций, представленных 16900 точечными нуклеотидными заменами (рис. 2а) и 895 инделами (рис. 2б). Среди полученных данных только 38% nsSNP обнаружены во всех образцах, 48% встречаются хотя бы в двух из трех проанализированных образцов, при этом 21% встречается как в исследуемом образце, так и в опубликованных данных. В случае транскриптомного анализа данных характер распределения результатов был похож (рис. 2в), а 24% инделов, об-

наруженных в исследуемом образце, также встречаются и в опубликованных данных (рис. 2г).

Сопоставление транскриптомных данных показало, что общими (для собственных и опубликованных данных) являются 4900 мутаций, что составляет 29% от общего количества на геномном уровне. Во всех четырех образцах выявлены только три несинонимичные однонуклеотидные замены, для исследуемого образца клеток HepG2 62% случаев выявленных замен являются уникальными событиями. Анализ встречаемости инделов показал, что практически все случаи уникальны для конкретного образца.

Необходимость изучения тонких процессов реализации генетической информации в рамках одного образца подтверждается наблюдением, что при исследовании одного образца на транскриптомном уровне реализуется 14% выявленных на геномном уровне мутаций, тогда как при сопоставлении опубликованных данных этот показатель равен 1%. Незначительная доля выявляемых мутаций обусловлена как биологическими причинами (экспрессируется около 65% генов, при этом транскрипты могут не содержать экзонов с мутациями), так и техническими (например, из-за менее точного анализа мутаций на транскриптомном уровне, по сравнению с исследованием генома).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отсутствие полной расшифровки генома (то есть путей реализации генома в фенотип) — не только фундаментальная, но и прикладная проблема. Развитие молекулярной биологии и медицины невозможно без целостного представления о функционировании организма, органов и тканей, клеток, без детального описания взаимосвязей генов, кодируемых ими продуктов и протекающих процессов.

На примере данного исследования показана необходимость изучения тонких процессов реализации генетической информации. Полученные сведения наглядно демонстрируют, что разные образцы одной и той же клеточной линии могут иметь разный молекулярный профиль, специфичный по выявляемым мутациям на разных омикс-уровнях. Изучение тонкостей процессов реализации генетической информации требует проведения последовательного комплексного анализа и на этапе становления основ системной биологии должно быть выполнено мультиомное профилирование для каждого исследуемого образца.

БЛАГОДАРНОСТИ

Секвенирование выполнено по заказу компанией Центр генетики и репродуктивной медицины “ГЕНЕТИКО”. Масс-спектрометрический анализ белков, а также биоинформатический анализ выполнен с ис-

пользованием оборудования и ресурсов Центра коллективного пользования “Протеом человека” при ИБМХ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа была выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 20-14-00328.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов. Исследуемые клетки HepG2 были получены из Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Deutschland).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aebersold R., Agar J.N., Amster I.J. et al.* How many human proteoforms are there? // *Nat. Chem. Biol.* 2018. V. 14. № 3. P. 206–214.
- Arzumanyan V.A., Kiseleva O.I., Poverennaya E.V.* The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 23. P. 13135.
- Edfors F., Danielsson F., Hallström B.B.M. et al.* Gene-specific correlation of RNA and protein levels in human cells and tissues // *Mol. Syst. Biol.* 2016. V. 12. № 10. P. 883.
- GTEX Consortium.* Human genomics. The genotype-tissue expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans // *Science.* 2015. V. 348. № 6235. P. 648–660.
- Kiseleva O., Poverennaya E., Shargunov A., Lisitsa A.* Proteomic Cinderella: customized analysis of bulky MS/MS data in one night // *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2018. V. 16. № 1. P. 1740011.
- Liu Y., Mi Y., Mueller T. et al.* Multi-omic measurements of heterogeneity in HeLa cells across laboratories // *Nat. Biotechnol.* 2019. V. 37. № 3. P. 314–322.
- Mellacheruvu D., Wright Z., Couzens A.L. et al.* The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification — mass spectrometry data // *Nat. Methods.* 2013. V. 10. № 8. C. 730–736.
- Pyatnitskiy M.A., Arzumanyan V.A., Radko S.P. et al.* Oxford nanopore minION direct RNA-Seq for systems biology // *Biology.* 2021. V. 10. № 11. P. 1131.
- Ponomarenko E.A., Poverennaya E.V., Ilgisonis E.V. et al.* The size of the human proteome: the width and depth // *Int. J. Anal. Chem.* 2016. V. 2016. P. 7436849.
- Poverennaya E.V., Ilgisonis E.V., Ponomarenko E.A. et al.* Why are the correlations between mRNA and protein levels so low among the 275 predicted protein-coding genes on human chromosome 18? // *J. Proteome Res.* 2017. V. 16. № 12. P. 4311–4318.
- Poverennaya E., Kiseleva O., Romanova A., Pyatnitskiy M.* Predicting functions of uncharacterized human proteins: from canonical to proteoforms // *Genes.* 2020. V. 11. № 6. P. 677.

- Smith L.M., Kelleher N.L.* Proteoform: a single term describing protein complexity // *Nat. Methods*. 2013. V. 10. № 3. P. 186–187.
- Tenzer S., Leidinger P., Backes C. et al.* Integrated quantitative proteomic and transcriptomic analysis of lung tumor and control tissue: a lung cancer showcase // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 12. P. 14857–14870.
- Trivedi U.H., Cézard T., Bridgett S., Montazam A. et al.* Quality control of next-generation sequencing data without a reference // *Front. Genet*. 2014. V. 5. P. 111.
- van der Auwera G.A., Carneiro M.O., Hartl C. et al.* From FastQ data to high confidence variant calls: the genome analysis toolkit best practices pipeline // *Curr. Protoc. Bioinformatics*. 2013. V. 43. № 1110. P. 11.10.1–11.10.33.
- Vavilov N., Ilgisonis E., Lisitsa A. et al.* Number of detected proteins as the function of the sensitivity of proteomic technology in human liver cells // *Curr. Protein Pept. Sci*. 2022. V. 23. № 4. P. 290–298.
- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W. et al.* The sequence of the human genome // *Science*. 2001. V. 291. № 5507. P. 1304–1351.
- Vitrinel B., Koh H.W.L., Kar F.M. et al.* Exploiting interdata relationships in next-generation proteomics analysis // *Mol. Cell. Proteomics*. 2019. V. 18. № 8. Suppl. 1. P. S5–S14.
- Yip Y.L., Famiglietti M., Gos A. et al.* Annotating single amino acid polymorphisms in the UniProt/Swiss-Prot knowledgebase // *Hum. Mutat*. 2008. V. 29. № 3. P. 361–366.

Non-Synonymous Single-Nucleotide Mutations and Indels: Contribution to the Molecular Postgenome Portrait of the HepG2 Cell Line

**E. V. Poverennaya^a, *, O. I. Kiseleva^a, V. A. Arzumanian^a,
M. V. Pyatnitskiy^a, I. V. Vakhrushev^a, and E. A. Ponomarenko^a**

^a*Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia*

**e-mail: k.poverennaya@gmail.com*

A comparative analysis of the results of genomic, transcriptomic, and proteomic profiling of HepG2 cell line was carried out in the gene-centric mode. The traceability at the transcriptomic and proteomic levels of changes associated with nonsynonymous single nucleotide substitutions and indels in the genome was shown. Most of the molecular events caused by aberrations at the genomic level are recorded at the transcriptomic level. Only single proteoforms encoded by the selected mutant genes can be reliably detected due to the methodological limitations of proteomic methods, which do not allow the registration of proteoforms present in the sample at low concentrations. The results are consistent with the previously obtained data of other scientific groups and describe the principal methodological solutions required for deciphering the molecular post-genomic portrait of biological samples with a resolution at the level of aberrant molecules.

Keywords: mutations, genome, transcriptome, proteome, proteoforms, molecular profiling

УДК Т612.115.3-615.273.53

РОЛЬ ГАПТОГЛОБИНА В ЗАЩИТЕ ОРГАНИЗМА ОТ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ГЕМОГЛОБИНА

© 2023 г. М. Г. Голубева*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

*e-mail: Mgolubeva46@mail.ru

Поступила в редакцию 16.11.2022 г.

После доработки 19.12.2022 г.

Принята к публикации 19.12.2022 г.

Представлены современные отечественные и зарубежные литературные данные о белке плазмы крови гаптоглобине, его строении, синтезе, функции и взаимодействии с гемоглобином. Показана способность гаптоглобина при взаимодействии с гемоглобином снижать токсическое действие последнего. Приводится описание клинических исследований такого взаимодействия при разных патологических состояниях – при сахарном диабете, серповидно-клеточной анемии, малярии, сепсисе и т.д. Отмечается, что разработка новых производных гаптоглобина может способствовать предотвращению токсичности гемоглобина при гемолитических заболеваниях.

Ключевые слова: гаптоглобин, гемоглобин, гемолиз, гемолитические заболевания

DOI: 10.31857/S0042132423020059, EDN: KMBVCP

ВВЕДЕНИЕ

Из клинической практики известно, что многие тяжелые патологические состояния – малярия, серповидно-клеточная анемия, сепсис, сахарный диабет – а также осложнения при тяжелой физической нагрузке и т.д. сопровождаются внутриклеточным гемолизом с образованием свободного гемоглобина (Hb), который обладает очень высокой токсичностью. Многие наследственные и приобретенные гемолитические анемии, в том числе сопряженные с гемоглобинопатиями, нарушениями комплемента и инфекционными заболеваниями, связаны с внутрисосудистым гемолизом. Разрушение эритроцитов в сосудистой системе приводит к системному воспалению, вазомоторной дисфункции, тромбофилии и пролиферативной васкулопатии (Yalamanoglu et al., 2018; van Avondt et al., 2019).

В норме обычно наблюдается внутриклеточный гемолиз, так как часть эритроцитов ежедневно разрушается, преимущественно в селезенке, а освободившийся Hb превращается в билирубин. Естественный гемолиз представляет собой непрерывную цепочку химических процессов, в результате которых состав эритроцитов обновляется при условии нормального функционирования структур ретикулоэндотелиальной системы (Голубева, 2019). Основным осложнением гемолиза является освобождение большого количества Hb в кровотоки и последующее образование вредных метаболитов, в частности лабильного гема. Защит-

ные механизмы – связывание гаптоглобина (Hр) и еще одного защитного белка плазмы гемопексина (Hрх) с гемом и ферментативное расщепление гем-оксигеназой – ограничивают токсичность молекул внеклеточного Hb при гемолизе. При гемолитических заболеваниях высокие уровни продуктов гемолиза снижают возможности этих защитных систем, что вызывает повышение окислительного и провоспалительного риска (Graw et al., 2017). Это актуально у пациентов в критическом состоянии, так как внеклеточный Hb вызывает сужение сосудов путем истощения эндогенного оксида азота NO, окислительного стресса и воспаления. Кроме того, внеклеточный Hb вызывает повреждение тканей, способствуя почечной недостаточности и повреждению слизистой кишечника. Высокий уровень смертности при сепсисе также связан с повышением концентрации внеклеточного Hb. В норме комплексы Hb–Hр и Hрх–гем выводятся из плазмы, поглощаемые печенью или селезенкой (Graw et al., 2018).

РОЛЬ ГЕМОЛИЗА В РАЗВИТИИ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ

Часто одним из неблагоприятных последствий массивного гемолиза является повреждение почек, которое повышает подверженность гемолитическим заболеваниям и вероятность смертности от них. Внутрисосудистая деструкция эритроцитов и

связанное с ней накопление гемопротеинов могут вызывать повреждение почек через ряд механизмов, включая окислительный стресс, через прямые или косвенные (посредством активации нейтрофилов и моноцитов) провоспалительные эффекты (van Avondt et al., 2019).

Однако далеко не всегда гемолиз вызывает тяжелые последствия и носит патологический характер. Хотелось бы обратить внимание на различные факторы, способствующие развитию анемии, связанной с физической нагрузкой. Они включают увеличение объема плазмы, окислительный стресс, вызванный физической нагрузкой, повышение температуры тела, ацидоз, желудочно-кишечное кровотечение, острое и хроническое воспаление, а также сжатие и повреждение эритроцитов в капиллярах, внутри сокращающихся мышц (Lippi, Sanchis-Gomar, 2019). Гемолиз, вызванный физической нагрузкой, можно условно определить как разрыв и разрушение эритроцитов во время физических упражнений. Значительная степень гемолиза при этом является обычным явлением после бега на дистанции любой протяженности (короткие, средние, длинные и сверхдлинные), что отражается в снижении H_r в сыворотке или плазме и в повышении концентрации свободного H_b в плазме. Такой внутрисосудистый гемолиз обычно незначителен и полностью исчезает в течение 24–48 ч. Показатели степени тяжести и точность их определения могут зависеть от метода определения внутрисосудистого гемолиза, от тренированности спортсмена, а также от количества, частоты и интенсивности соприкосновений стоп с поверхностью, но не от техники бега. Во время упражнений на выносливость осмотическая резистентность и структура мембран эритроцитов значительно изменяются. Как отмечают многие исследователи, прямое механическое повреждение, вызванное сильным ударом стопы о землю, повторяющаяся мышечная сократительная активность и сужение сосудов во внутренних органах являются тремя потенциальными источниками гемолиза, вызванного физической нагрузкой. Метаболические нарушения, развивающиеся во время тренировки, могут активно усиливать и ускорять гемолиз. Авторы полагают, что пациенты с эритроцитарными нарушениями могут быть особенно уязвимы к развитию гемолиза, вызванного физической нагрузкой (Lippi et al., 2012). Тем не менее установлено, что бег на длинные дистанции не вызывает клинически значимых изменений уровня H_b, гематокрита, количества эритроцитов или концентрации калия. Значительное снижение H_r после тренировки отражает определенную степень гемолиза, но концентрация внеклеточного H_b, остающаяся ниже 0.5 г/л, и незначительное изменение количества эритроцитов указывают на то, что гемолиз при ударе стопы очень умеренный или даже клинически незначительный (Lippi et al., 2012; Nishiie-Yano et al., 2020).

СТРОЕНИЕ ГАПТОГЛОБИНА

Установлено, что многие из побочных эффектов свободного H_b могут быть ослаблены поглотителем H_b белком острой фазы – H_r. H_r открыт в 1938 г., его название образовано от слова *harto* (лат.) – связывать. Это тетрамерный гликопротеин с молекулярной массой 200–250 кД, участвующий в защите организма от вредного воздействия свободного H_b, способный связывать H_b, предотвращая таким образом потерю железа и повреждение почек. В плазме его обычно 1 г/л. Он синтезируется в печени и постоянно присутствует в плазме крови. Под действием гормона роста, инсулина, эндотоксинов бактерий, простагландинов и цитокинов синтез H_r возрастает. Уровень H_r снижается при циррозе печени, гемоглобинурии, гемофилии, гемолитических анемиях. Повышение уровня H_r наблюдается при реакциях острой фазы, холестазе, болезни Ходжкина, коллагенозах, сепсисе, пневмонии, опухолях и др. (Alayash et al., 2013; Di Masi et al., 2020). При воспалении он выполняет функцию антиоксиданта, уменьшая повреждение клеток, препятствует росту некоторых бактерий, подавляет воспаление, снижает синтез простагландинов. Он стимулирует рост сосудов и участвует в регуляции иммунной системы (Шутов, ayzdogov.ru). H_r также играет роль в модуляции многих аспектов реакции острой фазы.

Подробно изучены (Di Masi et al., 2020) особенности строения H_r, и показано, что основная молекула H_r представляет собой тетрамерный белок, построенный из двух α/β -димеров. Каждый α/β -димер H_r кодируется одним геном и синтезируется в виде одного полипептида. После посттрансляционного протеазозависимого расщепления полипептида H_r α - и β -цепи соединяются дисульфидными мостиками остатком Cys15 каждой α -цепи с образованием зрелого белка H_r.

Ген H_r демонстрирует полиморфизм, причем различные генотипы не обладают одинаковой способностью бороться с эффектами свободного H_b (Fotsing et al., 2021). Поскольку ген H_r человека характеризуется двумя общими аллелями H_r1 и H_r2, могут возникнуть три основных генотипа: H_r1-1, H_r2-1 и H_r2-2 (Di Masi et al., 2020). Эти три структурных аллеля контролируют синтез основных фенотипов H_r: гомозиготных H_r1-1 и H_r2-2 и гетерозиготных H_r2-1, которые наследуются. Продукты аллелей H_r1-1 и H_r2-1 отличаются только одной аминокислотой, тогда как аллель H_r2-2 является результатом слияния H_r1-1 и H_r2-1, присутствует только у людей и дает начало более длинной α -цепи (Polticelli et al., 2008).

Многочисленные исследования показывают, что по фенотипу H_r можно судить об индивидуальной предрасположенности человека к различным заболеваниям. Авторы (Naryzny, Legina, 2021) установили, что H_r претерпевает различные

посттрансляционные модификации (ПТМ). Это структурные превращения (удаление сигнального пептида, расщепление молекулы-предшественника рге-Нр на две субъединицы α и β , ограниченный протеолиз α -цепей, образование дисульфидных связей, мультимеризация), а также химические модификации α -цепи и гликозилирование β -цепи. Гликозилирование β -цепи на четырех участках Asn — наиболее важная переменная ПТМ, которая регулирует структуру и функцию гликопротеина. Изучение модифицированных олигосахаридов β -цепи Нр стало основным направлением в изучении патологических процессов, в том числе злокачественных новообразований. Эти характеристики указывают на возможность существования Нр в виде множества протеоформ, вероятно, выполняющих различные функции. Гаптоглобины различных фенотипов могут быть разделены капиллярным электрофорезом. Они могут индуцировать расщепление α -2-глобулиновой зоны в электрофоретическом паттерне. Фенотипы Нр1-1 и Нр2-1 индуцируют значительное и умеренное расщепление зоны α -2-глобулина соответственно, тогда как Нр2-2 этого не делает. Гемолиз *in vitro* и миграция моноклонального компонента (то есть свободной от иммуноглобулина легкой цепи) также могут индуцировать расщепление α -2-глобулиновой зоны. В повседневной практике наличие фенотипов Нр1-1 и Нр2-1 в отчете об электрофорезе предупреждает клинициста о возможных патологических последствиях (Simon et al., 2020).

Обладание определенным фенотипом может обеспечить значительную защиту от развития некоторых расстройств: респираторных, сердечно-сосудистых и аутоиммунных заболеваний, злокачественных новообразований. Таким образом, знание фенотипа может помочь в прогнозе заболевания и позволить лучше адаптировать лечение к потребностям человека (Wassel, 2000).

МЕХАНИЗМЫ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ СВОБОДНОГО ГЕМОГЛОБИНА

Внеклеточный Нб признан триггером заболевания при гемолитических состояниях. Признаки первичных физиологических гемолитических состояний — серповидно-клеточной анемии, малярии, сепсиса — вероятно, вызванные свободным Нб, часто обнаруживаются в сердечно-сосудистой системе. В качестве потенциального механизма рассматривается токсичность Нб. Молекулярные механизмы этой токсичности, а также защитной активности Нр все еще не ясны.

Некоторые авторы предположили возможный биологический механизм для объяснения повышенного риска ишемической болезни сердца у лиц с гипергликемией и с генотипом Нр2-2 (Cahill et al., 2013). Нб, высвобождаемый из эритроцитов, быстро связывается с Нр с образованием комплекса Нр-Нб,

который подвергается клиренсу рецептором-поглотителем CD163. Однако этот клиренс CD163 нарушается при Нр2, а также в условиях гипергликемии *in vivo*, что приводит к увеличению количества циркулирующего комплекса Нр2-Нб у индивидуумов Нр2-2 с гипергликемией. Авторы показали, что гликозилирование Нб ухудшает способность белка Нр2-2 действовать в качестве антиоксиданта, что приводит к повышенной окислительной активности гликозилированного комплекса Нр2-Нб. Прооксидантный комплекс Нр2-Нб может связываться с липопротеинами высокой плотности — HDL (high-density lipoprotein) и продуцировать активные формы кислорода, которые окисляют холестерин и связанные с ним компоненты — аполипопротеин А (Apo1), глутатионпероксидазу (GPx) и лецитин-холестериновую ацетилтрансферазу (LCAT) — снижая функцию HDL (Cahill et al., 2013). Связываясь с Нб, они образуют комплекс, который поглощается клетками ретикулоэндотелиальной системы селезенки, претовращая стимуляцию им перекисного окисления липидов и образования свободных радикалов. Железо из Нб возвращается в образующиеся эритроциты, то есть Нр участвует в обмене железа в организме. Усиленный распад эритроцитов в кровяном русле приводит к увеличению поступления Нб и, соответственно, снижению уровня Нр, что является признаком внутрисосудистого гемолиза (Голубева, 2020; Levy et al., 2010).

Исследована (Levy et al., 2010) структурная, биохимическая и клеточная биологическая природа токсичности Нб в эндотелиальной клеточной системе в условиях перекисного стресса. Определены два основных механизма окислительной токсичности Нб, которые опосредованы продуктами деградации глобина и модифицированными видами липопротеинов соответственно. Эти два пути повреждения вызывают разнообразные воспалительные и цитотоксические реакции. Нр обеспечивает структурную стабилизацию Нб и защищает окислительные реакции Нб с липопротеинами, обеспечивая защиту от обоих путей токсичности. С помощью этих механизмов Нр смещает разрушительную псевдоперекисляющую реакцию Нб на потенциальную антиоксидантную функцию во время перекисного стресса (Schaer et al., 2013). Побочные эффекты повышенного Нб плазмы частично опосредованы истощением NO и приводят к сужению сосудов.

В настоящее время в качестве заменителя эритроцитов на основе Нб разрабатывается полимеризованный Нб (PolyHb) — перспективный носитель кислорода. К сожалению, коммерчески разработанные продукты состоят из молекул с низкой молекулярной массой — LMW (low molecular weight), которые удаляют NO и приводят к сужению сосудов и гипертонии. Нр в сочетании с очищенным апогемоглобином (apoHb), погло-

щающим гем, является потенциальным кандидатом на облегчение прессорного эффекта PolyHb. Авторами (Guéye et al., 2006; Buechler et al., 2020) оценивался защитный потенциал введения комплекса аroHb–Hr для смягчения вазоактивного ответа, вызванного переливанием LMW-PolyHb. Связывание Hr с PolyHb характеризовалось *in vitro*. При введении аroHb–PolyHb оценивали сосудосуживающие и прессорные эффекты PolyHb путем измерения системной и микроциркуляторной гемодинамики. Переливание LMW-PolyHb увеличивало среднее артериальное давление при одновременном снижении диаметра артериол и функциональной плотности капилляров. Однако переливание LMW-PolyHb животным, предварительно получавшим аroHb–Hr, предотвращало изменения среднего артериального давления, частоты сердечных сокращений, диаметра артериол, кровотока и функциональной плотности капилляров по отношению к уровню до переливания. Эти результаты показывают, что увеличение размера PolyHb после связывания с комплексом аroHb–Hr может помочь разделить PolyHb в сосудистом пространстве и, таким образом, уменьшить поглощение NO и токсичность, ответственную за сужение сосудов и системную гипертензию (Guéye et al., 2006; Buechler et al., 2020).

МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГАПТОГЛОБИНА И ГЕМОГЛОБИНА

Несмотря на подробную изученность Hb, его окислительная токсичность, связанная с циркуляцией свободного Hb, и его вклад в воспаление и осложнения при переливании крови только недавно стали активно исследоваться. Новое понимание защитных механизмов Hr и рассмотрение кристаллической структуры комплекса Hb–Hr позволили окончательно связать функциональное и структурное взаимодействие между двумя белками. Современные данные о взаимодействиях между Hb и Hr в условиях окислительного стресса и о том, как используются собственные повреждающие радикалы Hb, приводятся во многих исследованиях. Рассматриваются также потенциальные терапевтические преимущества использования Hr для инактивации и клиренса свободного Hb в ряде клинических условий (Alayash et al., 2013; Sargong-Kumankomah et al., 2022). Образовавшийся комплекс Hb–Hr направляется в систему макрофагов, в которых высвобождаются молекулы железа. Комплекс быстро выводится из кровотока с помощью специфического рецептора CD163 (Carter, Worwood, 2007). Попадая в систему кровообращения, железо соединяется с белком трансферрином и поступает в костный мозг для образования новых эритроцитов.

Рецептор поглотителя Hb – CD163 – макрофаг-специфический белок, и повышенная экс-

прессия этого рецептора – одно из основных изменений в переходе макрофагов на альтернативные активированные фенотипы при воспалении. Соответственно, высокая экспрессия CD163 в макрофагах характерна для тканей, реагирующих на воспаление. Удаление окислительного и провоспалительного Hb, приводящее к стимуляции гем-оксигеназы-1 и производству противовоспалительных метаболитов гема, указывает на то, что CD163 косвенно способствует противовоспалительной реакции. Таким образом, CD163 является потенциальным биомаркером воспаления и терапевтической мишенью, и эта биомаркерная форма CD163 представляет собой растворимый плазменный CD163, который возникает в результате повышенного выделения CD163, опосредованного ферментом расщепления – фактором некроза опухоли α (TNF- α). Из литературы известно, что плазменный уровень растворимого CD163 повышен в большом спектре острых и хронических воспалительных заболеваний. Как правило, повышение уровня CD163 гораздо более выражено при острых воспалениях – бактериемии, сепсисе, где уровень CD163 имеет отрицательную корреляцию с выживаемостью (Meher et al., 2021).

Мембранная форма CD163 в макрофагах представляет собой мишень для лекарств, направленных на макрофаги при воспалении. На модели воспаления у животных (крысы, мыши, свиньи) для значительного увеличения терапевтического индекса противовоспалительного глюкокортикоидного препарата, использовали антитела против CD163. В других исследованиях, выполненных также на животных, показано, что инъекции Hr ослабляют повреждения, вызванные Hb после переливания крови. Учитывая результаты экспериментов для оценки диагностических и терапевтических свойств этого белка, необходимо провести дальнейшие клинические исследования (Etzerodt, Moestrup, 2013).

Говоря о защитном действии Hr, необходимо кратко остановиться на другом защитном белке плазмы крови – Hrx. Это бета-1В-гликопротеин с молекулярной массой 63 кД, состоящий из одной полипептидной цепи, включающей 439 аминокислотных остатков. Этот белок кодируется геном *hpx* и принадлежит к семейству белков гемопексинов. Он обладает самым высоким родством к связыванию с гемом. Поступление Hrx и последующее его связывание со свободным гемом не только предотвращают его прооксидантное и провоспалительное действие, но и способствуют детоксикации свободного гема.

Как уже отмечалось, токсическое действие Hb связано не только с оксидативным стрессом и появлением свободных радикалов, но и с истощением NO, что приводит к сужению сосудов и гипертензии. В экспериментах на мышях линии CS781/6

проверена способность человеческих Нр или Нрх ингибировать неблагоприятные эффекты поглощения NO циркулирующим мышинным Нб. У здоровых бодрствующих мышей системные гемодинамические эффекты внутривенной коинфузии внеклеточного Нб и Нрх сравнились с гемодинамическими эффектами инфузии свободного Нб или только контрольного белка (альбумина). При этом изучались гемодинамические эффекты введения Нб и Нр, а также инъекции либо Нб, либо только альбумина мышам, которых кормили диетой с высоким содержанием жиров – HFD (high-fat diet), и мышам с диабетом. Сочетание Нр, но не Нрх, со свободным Нб в весовом соотношении 1 : 1 предотвращало системную гипертензию, вызванную Нб, у здоровых бодрствующих мышей. У мышей, получавших HFD, и у мышей с диабетом коинфузия Нр, смешанного с равной массой свободного Нб, не снимала гемоглобин-индуцированную гипертензию. Нр сохранял свободный Нб в плазме, но ни Нр, ни Нрх не влияли на способность Нб поглощать NO *ex vivo*. Авторы (Graw et al., 2017, 2018) полагают, что у здоровых мышей линии CS781/6 с нормальным эндотелием одновременное назначение Нр, но не Нрх, со свободным Нб предотвращает острую системную гипертензию, вызванную Нб, путем разделения Нб в плазме. При заболеваниях мышей, связанных с эндотелиальной дисфункцией, терапия Нр, по-видимому, недостаточна для предотвращения вазоконстрикции, вызванной Нб, поскольку лечение таким же количеством Нр не способно предотвратить вызванное Нб сужение сосудов у мышей с гиперлипидемией или сахарным диабетом – расстройствами, которые связаны с эндотелиальными нарушениями.

Интересное исследование было проведено *in vitro*, чтобы определить различаются ли фенотипы Нр по их защитному действию против окислительного стресса, вызванного внеклеточным Нб. Показано, что в мембранах эритроцитов человека в присутствии Нб и различных концентраций трех типов очищенного Нр наиболее активным показал себя Нр1-1, а Нр2-2 – наименее активным по защитному действию. Сообщается (Polticelli et al., 2008), что удалось впервые полностью смоделировать оба варианта Нр с их базовыми четвертичными структурами. Антиоксидантная роль Нр и фенотипическая зависимость подтверждены для предотвращения возможного окислительного повреждения, вызванного свободным Нб и высвобождением железа во время его катаболизма.

РОЛЬ ГАПТОГЛОБИНА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

В настоящее время известно множество факторов, способных поражать эритроциты. Прежде всего это наследственные дефекты эритроцитов

(гемоглобина, мембран, ферментов). Эритроциты могут поражаться при инфекционных заболеваниях – малярии, газовой гангрене, при поражении гемолитическими ядами. Усиленный распад эритроцитов может происходить при гемодиализе или при переливании несовместимой группы крови и после различных операций. Во всех случаях возникает гемолитическая анемия (Dhaliwal et al., 2004).

Поскольку Нр продуцируется паренхимой печени, ее гепатоциты способствуют повышению Нр в крови. Но биохимический анализ крови не всегда подтверждает факт возрастания концентрации Нр.

С одной стороны, Нр действует как антиоксидант, а с другой – как мощный иммунодепрессор функции лимфоцитов, и моделирует баланс Т-хелперов 1-го и 2-го типов в организме (Sadrzadeh, Vozorgmehr, 2004). При гемолизе, сопровождающем воспалительные реакции, количество Нб в крови очень велико. Поэтому требуется создание тяжело дисперсных комплексов и их транспортировка в систему макрофагов. В этом случае концентрация Нр должна уменьшаться. Для получения объективной картины без учета действия гемолиза важно сравнить полученные результаты с аналогичными тестами, полученными при диагностировании других белков из категории острофазных протеинов (Шутов, ayzdorov.ru).

Было продемонстрировано несколько функциональных различий между фенотипами Нр, которые, по-видимому, имеют важные биологические и клинические последствия. Полиморфизм Нр связан с распространенностью и клиническим развитием многих воспалительных заболеваний, включая инфекции, атеросклероз и аутоиммунные заболевания. Эти эффекты объясняются фенотипически зависимой модуляцией окислительного стресса и синтеза простагландинов. В последнее время появляется все больше данных о том, что Нр также участвует в иммунном ответе. Сильное генетическое давление, благоприятствующее фенотипу 2-2, предполагает важную роль Нр в патологии человека (Langlois, Delanghe, 1996; Cahill et al., 2013).

Как отмечают некоторые авторы (Alayash et al., 2013; Di Masi et al., 2020), поскольку Нр синтезируется в печени, ее повреждение приводит к снижению концентрации белка. При повреждении почек многие белки теряются с мочой, например Нр1-1 – форма Нр с наименьшей молекулярной массой. При аутоиммунных заболеваниях повышается активность фермента, участвующего в синтезе Нр, и его концентрация в крови нарастает.

Особое внимание уделяется серповидно-клеточной анемии (СКА) – наследственному заболеванию, обусловленному синтезом аномального гемоглобина S (HbS), изменением формы и свойств эритроцитов крови. При этом в крови присутствуют эритроциты серповидной формы. Дефект

структуры Hb характеризуется заменой глутаминовой кислоты валином в β -полипептидной цепи. Образующийся при этом HbS после потери присоединенного кислорода приобретает консистенцию высокополимерного геля и становится в 100 раз менее растворимым, чем нормальный HbA. В результате этого эритроциты, несущие дезоксигемоглобин S, деформируются и приобретают характерную полукруглую (серповидную) форму. Измененные эритроциты становятся ригидными, малопластичными, могут закупоривать капилляры, вызывая ишемию тканей, легко подвергаются аутогемолизу (krasotaimedicina.ru/diseases; Dhaliwal et al., 2004; Gbotosho et al., 2021).

Белки плазмы H α и H α x могут снижать внеклеточный Hb и общую липидно-окислительную способность гема плазмы, но истощаются при СКА. У больных с СКА, проходящих регулярную обменно-трансфузионную терапию, оценивали уровень окисления липидов. Образование малонового диальдегида – конечного продукта перекисного окисления липидов – увеличено у пациентов с СКА, по сравнению с контрольной группой. У пациентов степень окисления липидов связана с отсутствием H α , а также со снижением H α x в образцах плазмы. В посмертной легочной ткани, полученной от умерших от СКА, обнаружено окисленное отложение липопротеинов низкой плотности в легочной артерии. Отсутствие H α и снижение уровня H α x приводит к потере защиты от свободного Hb и от общего, опосредованного гемом, окисления липопротеинов низкой и высокой плотности и к повреждению тканей. Стратегия защиты от окисления липидов плазмы внеклеточным Hb и общим плазменным гемом (например, терапевтическая замена H α и H α x) может уменьшить вредное воздействие внеклеточного Hb и общего плазменного гема на сосудистую систему при СКА (Fotsing et al., 2021).

Многие авторы отмечают, что заболеваемость СКА распространена, главным образом, в странах Африки, Ближнего и Среднего Востока, Средиземноморского бассейна, Индии. Здесь частота носительства HbS среди коренного населения может достигать 40%. Так, при сопоставлении показателей крови пациентов с разной степенью тяжести СКА в Западном Камеруне сравнивали влияние разных генотипов H α на гематологические показатели, а также клинические проявления тяжести заболевания. Генотип H α 102 серповидно-клеточных пациентов (SS) и 115 здоровых лиц (60 AA и 55 AS) определяли аллельспецифической полимеразной цепной реакцией. Результаты показали, что генотип H α 2-2 был достоверно чаще ($p < 0.05$) представлен у пациентов с SS (54%), чем в контрольной группе AA и AS (27% и 29% соответственно), в то время как H α 2-1 был в основном обнаружен ($p < 0.05$) в AS (42%) и AA. Распределение генотипов H α не выявило каких-то существенных различий по гематологическим пара-

метрам между больными СКА и контрольной группой и по клиническим проявлениям тяжести заболевания между группами больных. Однако авторы отмечают, что необходимо комплексное исследование для изучения полиморфизма H α (с учетом антиоксидантного, липидного профилей и функциональности некоторых тканей при СКА) в Камеруне и других странах южных регионов (Fotsing et al., 2021; Meher et al., 2021).

Другая группа наследственных заболеваний – талассемии, развившиеся в результате нарушения соотношения α - или β -цепей специального белка глобина, образующего Hb. Талассемия проявляется гемолитической анемией различной степени выраженности. α -Талассемия – результат недостаточного образования α -глобиновых цепей. β -Талассемия – результат недостаточного синтеза β -глобиновых цепей (Сметанина, 2022).

СКА и талассемия – это гемоглобинопатии, характеризующиеся хроническим гемолизом.

Известно, что после субарахноидального кровоизлияния в головном мозге происходит длительное воздействие токсического свободного Hb. Большая его часть не вступает в комплекс с H α , присутствующим в очень низких концентрациях в мозге. В первые две недели после субарахноидального кровотечения экзогенно добавляемый H α связывается со свободным Hb, что рассматривается как его терапевтическое действие. В экспериментах на мышцах-самцах C57BL/6 показано, что моделирование субарахноидального кровоизлияния приводило к различным нарушениям в поведении животных. При этом вызванные Hb микроглиальные и синаптические изменения ослаблялись H α . Лечение не ослабляло спазма крупных сосудов мозга, но улучшало клинический результат, ограничивая диффузию Hb в паренхиму и уменьшая спазм мелких сосудов. Авторы полагают, что токсичность Hb может быть предотвращена H α независимо от спазма крупных сосудов (Garland et al., 2020).

Сахарный диабет 2-го типа (СД2) – тяжелое заболевание, связанное с ожирением и повышенным окислительным стрессом. В литературе представлены исследования, в которых оценивали связь между уровнями H α , полиморфизмом гена H α 1–H α 2 и клиническими и лабораторными параметрами у пациентов с СД2. Выборка исследования состояла из 102 пациентов с СД2 и 62 контрольных – без СД2. Уровни H α измеряли с помощью иммуноферментного анализа, а генотипирование H α проводили с использованием специальной двухступенчатой полимеразной цепной реакции. Установили, что уровень H α выше у пациентов с СД2, по сравнению с контрольной группой. Пациенты с СД2 с высоким кровяным давлением имели более высокие уровни H α , чем пациенты без этой сопутствующей патологии. Пациенты с ожирением и СД2 имели более высокие уровни

Hp, по сравнению с контрольной группой с ожирением и с пациентами с СД2 без ожирения. Эти результаты свидетельствуют о том, что на уровни Hp влияет полиморфизм Hp1–Hp2, ожирение, воспалительный статус и высокое кровяное давление (Rodrigues et al., 2019; Deckmyn et al., 2022). Некоторые авторы полагают: лица с генотипом Hp2-2 и с СД, по-видимому, подвергаются значительно более высокому риску микрососудистых и макрососудистых осложнений. Фармакологическая стратегия введения доз антиоксидантов конкретно лицам с СД2 и Hp2-2 может быть клинически эффективной (Asleh et al., 2005; Levy et al., 2010).

У пациентов с ожирением развивается хроническое воспалительное состояние, в результате чего возникают осложнения, причем источником большинства воспалительных молекул является белая жировая ткань – WAT (white adipose tissue), которая при чрезмерном наборе веса инфильтрируется макрофагами и лимфоцитами и претерпевает важные изменения в экспрессии своих генов. Давно известно, что Hp – типичный маркер воспаления и основной носитель свободного Hb – входит в состав печеночной острой фазы ответа, но также по его экспрессии в WAT и в плазме можно судить о степени ожирения (Maffei et al., 2016).

Большое внимание в литературе уделяется изучению связи метаболического синдрома (МС) с уровнем Hp в кровотоке. Хотя печень является основным источником Hp, в исследованиях выявлено, что Hp также секретируется в плазму жировой ткани. Ранее показано, что уровень Hp в сыворотке положительно связан с размерами жировых отложений. Исследования подтверждают более высокие уровни Hp в сыворотке у пациентов с МС и у пациентов с повышенным уровнем или глюкозы, или артериального давления.

Некоторые исследователи при изучении влияния Hp на риски ожирения и кардиометаболической дисфункции обнаружили связь определенных фенотипов белка с потерей веса, вызванной диетой. Пациенты были поделены на группы в зависимости от фенотипа Hp и используемой диетической программы. Фенотипирование выполняли с использованием гель-электрофореза.

Значительное снижение массы тела, окружности талии, уровня инсулина в плазме, свободного Hb обнаруживали женщины с фенотипом Hp1-1. У них отмечены снижение ряда показателей, улучшение общего состояния, снижение степени абдоминального ожирения и повышение чувствительности к инсулину, а также уменьшение выраженности МС при соблюдении низкокалорийной диеты. Результаты этого исследования подтверждают вероятное влияние генов и возможность диеты обуславливать потерю веса (Tang et al., 2020).

Установлено, что у лиц с МС уровни Hb, ферритина, а также эритропоэтина и Hp были выше, чем в контрольной группе. Повышение уровней отдельных белков может быть связано с разными осложнениями при МС: показано, что уровень Hp имеет прямую корреляцию с уровнями и артериального давления, и глюкозы в кровотоке, тогда как уровень Hb был выше при любых отклонениях при МС (Hämäläinen et al., 2012).

В наше время в условиях коронавирусной пандемии изучали взаимосвязь уровней Hp, эритропоэтина, других биохимических показателей сыворотки крови и степени тяжести заболевания COVID-19. Установлено, что уровень Hb значительно ниже у пациентов с тяжелым и умеренным течением болезни, а также в группе умерших. Уровень ферритина, который, как известно, является внутриклеточным депо железа, положительно коррелировал с тяжестью заболевания. Уровень железа достоверно ниже у больных, по сравнению со здоровыми. Обнаружено, что значения Hp значительно ниже в группе интубированных и умерших также, как уровень эритропоэтина (Yağcı et al., 2021).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как уже отмечалось ранее, Hp является белком связывания и клиренса Hb в плазме человека и эффективным антагонистом токсичности Hb в результате физиологического оборота красных клеток крови. Однако эндогенные концентрации Hp недостаточны для обеспечения защиты от заболеваний, вызванных Hb, – СКА, сепсиса, реакции переливания, гемолиза различного происхождения, или после субарахноидального кровоизлияния. В результате растет интерес к разработке терапии Hp как блокатора токсичности свободного Hb. Открываются перспективы использования Hp в качестве терапевтического белка (Buechler et al., 2020).

Образование комплекса Hb–Hp снижает окислительные свойства гема Hb и способствует распознаванию макрофагальным рецептором-поглотителем CD163. Это приводит к разрушению комплекса Hb–Hp и катаболизму гема гемоксигеназой и биливердинредуктазой. Генные дубликации части или всего гена Hp в эволюции приматов привели к вариантным продуктам генов Hp, которые в совокупности могут быть обозначены как гаптоглобины (Hps), поскольку все они связывают Hb. Эти вариантные продукты включают в себя специфичные для человека мультимерные фенотипы Hp у индивидуумов. Белок, связанный с Hp (Hpr), – еще один продукт дубликации Hp у человека и других приматов. Об альтернативных функциях варианта Hps свидетельствуют многочисленные сообщения об ассоциации между фенотипами Hp и заболеванием, а также выяснение специфической роли Hpr во врожденной иммунной защите. Изучение структурно-функциональной обуслов-

ленности эффектов Нр дает представление о том, как Нр выполняет важные функции, в частности детоксикации/удаления Нв. Разработка новых производных Нр может способствовать предотвращению токсичности Нв при гемолитических заболеваниях. Кроме того, новые структурные знания позволят идентифицировать еще неизвестные функции, основанные на других, относящихся к патологии, биологических взаимодействиях, связанных с Нps (Andersen et al., 2017).

Нр в основном вырабатывается в печени и функционально важен для связывания свободного Нв с лизированными эритроцитами *in vivo*, предотвращая его токсическое действие. Поскольку уровень Нр истощается в присутствии большого количества свободного Нв, снижение уровня Нр является маркером гемолиза. Несмотря на всю важность и актуальность проблемы, небольшое количество литературы затрудняет интерпретацию результатов. Для тестирования разработаны различные методики, включая спектрофотометрию, иммунореактивные методы и гель-электрофорез. Каждая из них обладает определенными преимуществами и недостатками. До последнего времени нет единого стандарта для определения гемолиза. Все исследования должны опираться на комбинацию факторов, при этом необходимо учитывать возможные различия и ограничения тестирования. Возможно положительные результаты могут возникать при неправильной подготовке образцов, циррозе печени, повышенном уровне эстрогена и гемодилюции, при применении андрогенов и кортикостероидов. Все эти обстоятельства могут затруднять тестирование Нр в условиях воспаления. С учетом широкого использования Нр-тестирования отмечены (Shih et al., 2014) важность понимания принципов и необходимость правильной интерпретации этого теста клиницистами и сотрудниками лабораторий.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты проводили в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF), и с декларацией о гуманном отношении к животным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Голубева М.Г. Осмотическая резистентность эритроцитов, методы определения и коррекции, значение при различных патологиях // Успехи соврем. биол. 2019. Т. 139. № 5. С. 446–456.

- Голубева М.Г. Влияние физической нагрузки на функциональное состояние мембран эритроцитов // Спорт. мед. 2020. Т. 10. № 2. С. 55–64.
- Сметанина Н.С. <https://rare-diseases.ru/docs/talas.pdf>
- Шутов М.Е. Гаптоглобин — что это такое? Показатели нормы // https://www.ayzdorov.ru/ttermini_gaptoglobin.php
- Alayash A.I.A., Andersen F.C.B., Maestrup S.K., Bülow L. Haptoglobin: the hemoglobin detoxifier in plasma // Trends Biotechnol. 2013. V. 31. № 1. P. 2–3.
- Andersen C.B.F., Stødkilde K., Sæderup K.L. et al. Haptoglobin // Antioxid. Redox Signal. 2017. V. 26. № 14. P. 814–831.
- Asleh R., Guetta J., Kalet-Litman S. et al. Haptoglobin genotype- and diabetes-dependent differences in iron-mediated oxidative stress *in vitro* and *in vivo* // Circ. Res. 2005. V. 96. № 4. P. 435–441.
- Belcher D.A., Munoz C., Pires I.S. et al. Apohemoglobin — haptoglobin complexes attenuate the hypertensive response to low-molecular-weight polymerized hemoglobin // Blood Adv. 2020. V. 4. № 12. P. 2739–2750.
- Buechler P.W., Humar R., Schaer D.J. Haptoglobin therapeutics and compartmentalization of cell-free hemoglobin toxicity // Trends Mol. Med. 2020. V. 26. № 7. P. 683–697.
- Cahill L., Levy A., Chiuve E. et al. Haptoglobin genotype is a consistent marker of coronary heart disease risk among individuals with elevated glycosylated hemoglobin // J. Am. Coll. Cardiol. 2013. V. 61. P. 728–737.
- Carter K., Worwood M. Haptoglobin: review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases // Int. J. Lab. Hematol. 2007. V. 29. № 2. P. 92–110.
- Deckmyn O., Poynard T., Bedossa P. et al. Clinical interest of serum alpha-2 macroglobulin, apolipoprotein A₁, and haptoglobin in patients with non-alcoholic fatty liver disease, with and without type 2 diabetes, before or during COVID-19 // Biomedicines. 2022. V. 10. № 3. P. 699.
- Dhaliwal G., Cornett P., Tierney L. Hemolytic anemia // Am. Fam. Physician. 2004. V. 69. № 11. P. 2599–2606.
- Di Masi A., De Simone G., Ciaccio C. et al. Haptoglobin: from hemoglobin scavenging to human health // Mol. Aspects Med. 2020. V. 73. P. 100851.
- Etzerodt A., Moestrup S.K. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects // Antioxid. Redox Signal. 2013. V. 18. № 17. P. 2352–2363.
- Fotsing C.B.K., Pieme C.A., Nya P.C.B. et al. Haptoglobin gene polymorphism among sickle cell patients in West Cameroon: hematological and clinical implication // Adv. Hematol. 2021. V. 2021. P. 6939413.
- Garland P., Morton M., Haskins W. et al. Haemoglobin causes neuronal damage *in vivo* which is preventable by haptoglobin // Brain Commun. 2020. V. 2. № 1. P. fcz053.
- Gbotosho O., Kapetanaki M., Kato J. The worst things in life are free: the role of free heme in sickle cell disease // Front. Immunol. 2021. V. 11. P. 561917.
- Graw J.A., Baron D.M., Francis R.C.E. The relevance of hemolysis in anesthesia and intensive care medicine // Anasthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. 2018. V. 53. № 4. P. 296–305.

- Graw J.A., Yu B., Rezoagli E. et al. Endothelial dysfunction inhibits the ability of haptoglobin to prevent hemoglobin-induced hypertension // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2017. V. 312. № 6. P. H1120–H1127.
- Guéye P.M., Glasser N., Féraud G., Lessinger J.-M. Influence of human haptoglobin polymorphism on oxidative stress induced by free hemoglobin on red blood cells // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2006. V. 44. № 5. P. 542–547.
- Hämäläinen P., Saltevo J., Kautiainen H. et al. Erythropoietin, ferritin, haptoglobin, hemoglobin and transferrin receptor in metabolic syndrome: a case control study // *Cardiovasc. Diabetol.* 2012. V. 11. P. 116.
- Langlois M.R., Delanghe J.R. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans // *Clin. Chem.* 1996. V. 42. № 10. P. 1589–1600.
- Levy A.P., Asleh R., Blum S. et al. Haptoglobin: basic and clinical aspects // *Antioxid. Redox. Signal.* 2010. V. 12. № 2. P. 293–304.
- Lippi G., Schena F., Salvagno G.L. et al. Foot-strike haemolysis after a 60-km ultramarathon // *Blood Transfus.* 2012. V. 10. № 3. P. 377–383.
- Lippi G., Sanchis-Gomar F. Epidemiological, biological and clinical update on exercise-induced hemolysis // *Ann. Transl. Med.* 2019. V. 7. № 12. P. 270.
- Maffei M., Barone I., Scabia G., Santini F. The multifaceted haptoglobin in the context of adipose tissue and metabolism // *Endocr. Rev.* 2016. V. 37. № 4. P. 403–416.
- Meher S., Mohanty P.K., Patel S. et al. Haptoglobin genotypes associated with vaso-occlusive crisis in sickle anemia patients of Eastern India // *Hemoglobin.* 2021. V. 45. P. 358–364.
- Naryzny S.N., Legina O.K. Haptoglobin as a biomarker // *Biochem. Mosc. Suppl. B Biomed. Chem.* 2021. V. 15. № 3. P. 184–198.
- Nishiie-Yano R., Hirayama S., Tamura M. et al. Hemolysis is responsible for elevation of serum iron concentration after regular exercises in judo athletes // *Biol. Trace Elem. Res.* 2020. V. 197. № 1. P. 63–69.
- Polticelli F., Bocedi A., Minervini G., Ascenzi P. Human haptoglobin structure and function – a molecular modelling study // *FEBS J.* 2008. V. 275. № 22. P. 5648–5656.
- Rodrigues K.F., Pietrani N.T., Carvalho L.M.L. et al. Haptoglobin levels are influenced by Hp1–Hp2 polymorphism, obesity, inflammation, and hypertension in type 2 diabetes mellitus // *Endocrinol. Diabetes Nutr.* 2019. V. 66. № 2. P. 99–107.
- Sadrzadeh S., Bozorgmehr J. Haptoglobin phenotypes in health and disorders // *Am. J. Clin. Pathol.* 2004. V. 121. Suppl. S97–104.
- Sarpong-Kumankomah S.K.B., Knox K.B., Kelly M.E. et al. Quantification of human plasma metalloproteins in multiple sclerosis, ischemic stroke and healthy controls reveals an association of haptoglobin–hemoglobin complexes with age // *PLoS One.* 2022. V. 17. № 1. P. e0262160.
- Schaer C.A., Deuel J.W., Bittermann A.G. et al. Mechanisms of haptoglobin protection against hemoglobin peroxidation triggered endothelial damage // *Cell. Death Differ.* 2013. V. 20. № 11. P. 1569–1579.
- Shih A., MacFarlane A., Verhovsek M. Haptoglobin testing in hemolysis: measurement and interpretation // *Am. J. Hematol.* 2014. V. 89. № 4. P. 443–447.
- Simon A., Schneider N., Gillery Ph., Oudart J.-B. Clinical and biological features of haptoglobin phenotypes // *Ann. Biol. Clin.* 2020. V. 78. № 5. P. 493–498.
- Tang K., Huang S., Cheng T. et al. Haptoglobin phenotype influences the effectiveness of diet-induced weight loss in middle-age abdominally obese women with metabolic abnormalities // *Clin. Nutr.* 2020. V. 39. № 1. P. 225–233.
- van Avondt K., Nur E., Zeerleder S. Mechanisms of haemolysis-induced kidney injury // *Nat. Rev. Nephrol.* 2019. V. 15. № 11. P. 671–692.
- Wassel J. Haptoglobin: function and polymorphism // *Clin. Lab.* 2000. V. 46. № 11–12. P. 547–552.
- Yağci S., Serin E., Acicbe O. et al. The relationship between serum erythropoietin, hepcidin, and haptoglobin levels with disease severity and other biochemical values in patients with COVID-19 // *Int. J. Lab. Hematol.* 2021. V. 43. Suppl. 1. P. 142–151.
- Yalamanoglu A., Deuel J.W., Hunt R.C. et al. Depletion of haptoglobin and hemopexin promote hemoglobin-mediated lipoprotein oxidation in sickle cell disease // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2018. V. 315. № 5. P. L765–L774.

Role of Haptoglobin in Protecting the Toxic Effects of Hemoglobin in Various Pathologies

M. G. Golubeva*

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia

*e-mail: Mgolubeva46@mail.ru

The review presents modern domestic and foreign literature data on the blood plasma protein haptoglobin, its structure, synthesis, function and interaction with hemoglobin. The ability of haptoglobin in interaction with hemoglobin to reduce the toxic effect of the latter is shown. Clinical studies of such interaction in various pathological conditions such as diabetes mellitus, sickle cell anemia, malaria, sepsis, etc. are described. It is noted that the development of new haptoglobin derivatives can contribute to the prevention of hemoglobin toxicity in hemolytic diseases.

Keywords: haptoglobin, hemoglobin, hemolysis, hemolytic diseases

УДК 612.084

СТЕРЕОТАКСИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА: АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ПОДХОДЫ

© 2023 г. С. В. Альбертин*

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

**e-mail: albertinsv@infran.ru*

Поступила в редакцию 02.08.2022 г.

После доработки 27.10.2022 г.

Принята к публикации 27.10.2022 г.

Рассматриваются возможности различных способов определения локализации малоразмерных клеточных образований мозга у животных. Показаны преимущества электрофизиологического подхода, используемого при локализации тестируемых ядерных структур мозга, их селективного повреждения и последующей гистологической верификации места и размера повреждения мозговой ткани. Предложены методические рекомендации, которые обеспечивают более точное определение координат тестируемых структур мозга, что приводит к значительному сокращению времени на проведение запланированных исследований и затрат на их выполнение за счет отсутствия необходимости включения в эксперимент большого количества подопытных животных.

Ключевые слова: электрофизиологическое картирование мозга, локализация структур, их повреждение и гистологическая верификация

DOI: 10.31857/S0042132423020035, **EDN:** КМАJTR

ВВЕДЕНИЕ

Основная проблема, которая стоит перед экспериментатором при исследовании функций ЦНС, — повышение точности при определении локализации исследуемых образований мозга, необходимой для корректного введения электродов и фармакологических канюль в тестируемые структуры головного и спинного мозга (Li et al., 2016; Sedrak et al., 2020).

Основные причины снижения точности попаданий при использовании стандартного стереотаксического метода определения координат по атласу мозга: индивидуальные анатомические вариации черепа, различия в размерах мозга и вариативное местоположение референтных точек (брегма, лямбда) у животных подопытной группы. Другие причины разброса попаданий электродов в тестируемые структуры мозга — ошибки экспериментатора при использовании стереотаксических аппаратов, а также эксплуатационные неудобства, отмечаемые исследователями у ряда серийно выпускаемых стереотаксических приборов, которые не обеспечивают свободного подхода к тестируемым структурам головного и спинного мозга и точной фиксации головы и позвоночника животных в единой системе стереотаксических координат с учетом естественных анатомических (кифоз, лордоз) и патологических (сколиозы) изгибов позвоночника.

Следует подчеркнуть, что вероятность и выраженность ошибок особенно высока при тестировании компактных ядерных образований головного мозга, а также ядер, имеющих сложную геометрическую форму у животных малого размера (Wang et al., 2020; Liu et al., 2021), что в ряде случаев исключает возможность точного введения электродов и фармакологических канюль в исследуемые ядра мозга и их последующее выключение при использовании стандартных подходов.

Задача публикуемой статьи — показать возможности альтернативных подходов, используемых при установлении локализации тестируемых ядерных структур мозга, их селективного повреждения и последующей гистологической верификации места и размера повреждения.

ВОЗМОЖНОСТИ СТЕРЕОТАКСИЧЕСКОГО ПОДХОДА, ИСПОЛЬЗУЕМОГО ПРИ ЛОКАЛИЗАЦИИ КОМПАКТНЫХ ЯДЕРНЫХ СТРУКТУР МОЗГА ЖИВОТНЫХ

При проведении нейрофизиологических исследований обычно используется стереотаксический метод введения электродов в тестируемые структуры по координатам, рассчитанным с помощью атласа мозга различных видов лабораторных животных, которые анатомически привязаны к раз-

личным референтным точкам черепа лабораторных животных (Мещерский, 1961; Jasper, Ajmon-Marsan, 1954; Pellegrino et al., 1979; Paxinos, Watson, 2013). При этом точность попадания электрода в выбранную структуру мозга, а также локализация и размер повреждений мозга, произведенных путем пропускания тока через этот электрод, определяются гистологически после завершения многодневных хронических экспериментов на оперированных животных. Морфологические исследования срезов мозга выявляют в большинстве экспериментальных работ, выполненных с применением стереотаксического метода погружения электродов, значительный разброс в локализации электродов и/или произведенных электролитических повреждений. При этом экспериментатору *post factum* приходится выбраковывать значительное число подопытных животных, повреждения мозга которых не соответствуют задаче эксперимента, что приводит к существенному (многократному) увеличению времени на проведение запланированных исследований и материальных затрат на их выполнение, в частности за счет необходимости включения в эксперимент большего числа животных (Альбертин, 2014).

Малые размеры ядерных образований, например вентромедиального ядра гипоталамуса или прилежащего ядра (*nucleus accumbens septi*), особенно у мелких лабораторных животных (крысы, мыши), чрезвычайно затрудняют их безошибочную локализацию и последующее избирательное выключение с использованием стандартных физиологических процедур, что вызывает значительные сложности при изучении селективной роли данных образований в организации различных форм врожденного и приобретенного поведения животных и в патогенезе неврологических заболеваний.

По расчетам (Мещерский, 1961), для попадания электродов у десяти кроликов в вентромедиальное ядро гипоталамуса, имеющее приблизительно сферическую форму с диаметром 0.8 мм и сопоставимое с размерами отдельных областей прилежащего ядра, следует прооперировать, по крайней мере, 100 животных. Как уже отмечалось, основные причины разброса попаданий при использовании стандартного стереотаксического метода определения координат по атласу мозга — индивидуальные анатомические вариации черепа, различия в размерах мозга и вариативное местоположение референтных точек (брегма, лямбда) у животных подопытной группы, а также ошибки экспериментатора при использовании стереотаксических аппаратов. Вероятность и выраженность ошибок еще выше при тестировании компактных ядерных образований, имеющих сложную геометрическую форму и морфофункциональную организацию, что в ряде

случаев исключает возможность точного введения электродов и фармакологических канюль в исследуемые отделы мозга и их последующее выключение при использовании стандартных подходов.

Так, анатомические (Zahm, Brog, 1992), нейрорхимические (Jongen-Relo et al., 1994) и нейрофизиологические (Mulder, 1996) исследования разных лет показали, что *n. accumbens septi*, входящее в состав вентрального стриатума у крыс, несмотря на свои небольшие размеры, является гетерогенным образованием и состоит из двух отчетливо дифференцируемых отделов: сердцевины (*core part*) ядра, концентрирующейся вокруг передней комиссуры (*anterior commissura*) и оболочки (*shell part*) — узкого клеточного образования, медиально, вентрально и латерально примыкающего к сердцевине ядра. Некоторые исследователи (Zahm, Heimer, 1993) у крыс выделяют дополнительно ростральный полюс (*rostral pole*) ядра, а в оболочке различают вентролатеральный (*ventrolateral*) и каудомедиальный (*medial shell*) отделы ядра, дифференцируемые по содержанию медиаторов и нейропептидов, а также распределению афферентных и эфферентных проекций (Miyamoto et al., 1980; Beijer et al., 1994).

Гистологический анализ повреждений прилежащего ядра у крыс, выполненных по стереотаксическим координатам атласа мозга, показал наличие у оперированных животных неселективных, преимущественно комбинированных повреждений разного размера, локализованных в различных отделах прилежащего ядра и соседних структурах мозга (Miyamoto et al., 1980; Sutherland, Rodriguez, 1989). Малопродуктивными оказались также попытки нейрорхимического выключения по стереотаксическим координатам различных отделов прилежащего ядра, в частности его медиального отдела (*medial shell part*), с помощью инъекции нейроблокаторов и нейротоксинов (Seamans, Fillips 1994; Bowman, Brown, 1998), которые даже при точном попадании канюли в ядро не могли обеспечить полного выключения медиального отдела прилежащего ядра — вытянутой узкой области, граничащей с латеральным отделом (*core part*) тестируемого ядра, но, напротив, создавали условия для нежелательной диффузии вводимого вещества в соседний латеральный отдел прилежащего ядра и в другие структуры мозга. Следует также учесть, что нейроны медиального отдела прилежащего ядра по-разному реагируют на процедуру повреждения: они чувствительны к электролитическому повреждению ядра, но более устойчивы к нейротоксическому повреждению NMDA (Kodsi, Swerdlow, 1997). Другие исследователи сообщают, что латеральный отдел прилежащего ядра более чувствителен к инъекции квинолиновой (*quinolinic*) кисло-

ты, а медиальный отдел более подвержен влиянию иботеновой (ibotenic) кислоты (Parkinson et al., 1999). Очевидно, что это обстоятельство также осложняет оценку результатов исследований, использующих разные нейротоксины для выключения различных отделов прилежащего ядра.

Вместе с тем, практика физиологического эксперимента показала, что эффективный контроль местоположения электрода в исследуемой структуре может быть основан на регистрации вызванных потенциалов в тестируемом образовании мозга при активации ее сенсорных входов (Альтман, Марусева, 1959) или при электрической стимуляции ее афферентных проекций (Freeman, 1959), осуществляемых во время стереотаксической операции вживления электродов.

В этой связи мы исследовали возможность точной локализации и селективного электролитического повреждения наиболее труднодоступной и наименее исследованной медиальной области (medial shell part) прилежащего ядра с помощью разработанного нами инновационного метода электрофизиологического картирования *n. accumbens* — серийной регистрации фокальных потенциалов, вызванных электрической стимуляцией гиппокампальных проекций, входящих в состав проводящих путей *fimbria-fornix* гиппокампа (Альбертин, 2005; Albertin, Wiener, 2015).

ПРОЦЕДУРА ЛОКАЛИЗАЦИИ И ПОВРЕЖДЕНИЯ МЕДИАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ ПРИЛЕЖАЩЕГО ЯДРА

Исследование выполнено на восьми подопытных крысах линии Long-Evans. Операцию проводили под нембуталовым наркозом (40 мг/кг, внутривенно). Для стимуляции использовали биполярные электроды диаметром 60 мкм, изготовленные из нержавеющей стали и изолированные лаком за исключением кончика длиной 800 мкм. Стимулирующие электроды погружали в мозг в области проводящей системы *fimbria-fornix* с координатами: AP = -1.3 мм; ML = 0.9–1.9 мм; H = 3.7 мм, они топографически соответствовали локализации вентрального субикулярного пути, проекции которого селективно оканчиваются в медиальной области прилежащего ядра. Изготовленные из вольфрама или нержавеющей стали электроды диаметром 100 мкм, предназначенные для регистрации фокальных потенциалов в *n. accumbens*, впоследствии использовали в качестве прижигающих. Свободным от лаковой изоляции остается кончик электрода длиной 500 мкм.

Картирование фокальных потенциалов осуществляли в поисковом режиме с помощью одной или более трековых проходок по координатам атласа мозга (Paxinos, Watson, 2013): AP = 1.0–

1.6 мм; ML = 0.65–0.85 мм; H = 6.4–8.0 мм. Стимуляцию *fimbria-fornix* проводили одиночными прямоугольными импульсами постоянного тока (I = 0.4–0.6 мкА, t = 0.2 мкс) ипсилатерально регистрирующему электроду, введенному в прилежащее ядро.

Фокальные вызванные потенциалы, отводимые в *n. accumbens* монополярно, усиливали посредством дифференциального усилителя Model 1800 (A-M System, Inc., USA) и вводили в компьютер посредством входного устройства CED 1401 (Cambridge Electronic Design, Ltd., UK), где подвергали усреднению по десяти ответам, отводимым от каждой тестируемой точки прилежащего ядра. Интервал между отдельными стимулами — 7 с. Расстояние между отдельными точками отведения — 0.5 мм.

Показателем нахождения электрода в медиальной области *n. accumbens* являлось отведение двухфазного позитивного фокального потенциала с пиковой латентностью 8 и 20 мс (рис. 1), что, по данным (Mulder, 1996), соответствует моносинаптическому и полисинаптическому (путем антимонной активации гиппокампа) ответам нейронов прилежащего ядра при электрической стимуляции проекций вентрального субикулюма, следующих в составе проводящей системы *fimbria-fornix*. Выключение этого пути с помощью электролитического разрушения, инъекции лидокаина или глюантагониста кинуренина, как правило, ведет к исчезновению этих ответов в прилежащем ядре (Mulder, 1996).

При отсутствии в трековой проходке потенциалов с вышеуказанным паттерном ответа координаты электрода менялись, и поиск продолжался в новом треке.

При регистрации двухфазных позитивных потенциалов в трех соседних точках медиальной области ядра, ориентированных в дорсовентральном направлении и разделенных промежутком не менее 0.5 мм, производили процедуру электролитического прижигания путем подачи через данный электрод электрического постоянного тока, монополярно (I = 100 мкА, t = 20 с).

Прижигание в указанных точках ядра производилось последовательно, начиная с наиболее глубоко расположенной точки, и далее осуществлялось в дорсальном направлении. После завершения прижигания в данном полушарии оба электрода извлекались и устанавливались в соответствующие области противоположного полушария, а процедура картирования вызванных потенциалов и электролитического прижигания ядра повторялась в указанном выше порядке.

В исследовании также использовали контрольных животных, которых подвергали при операции тем же манипуляциям (апликация электрода и стимуляция проводящей системы *fimbria-for-*

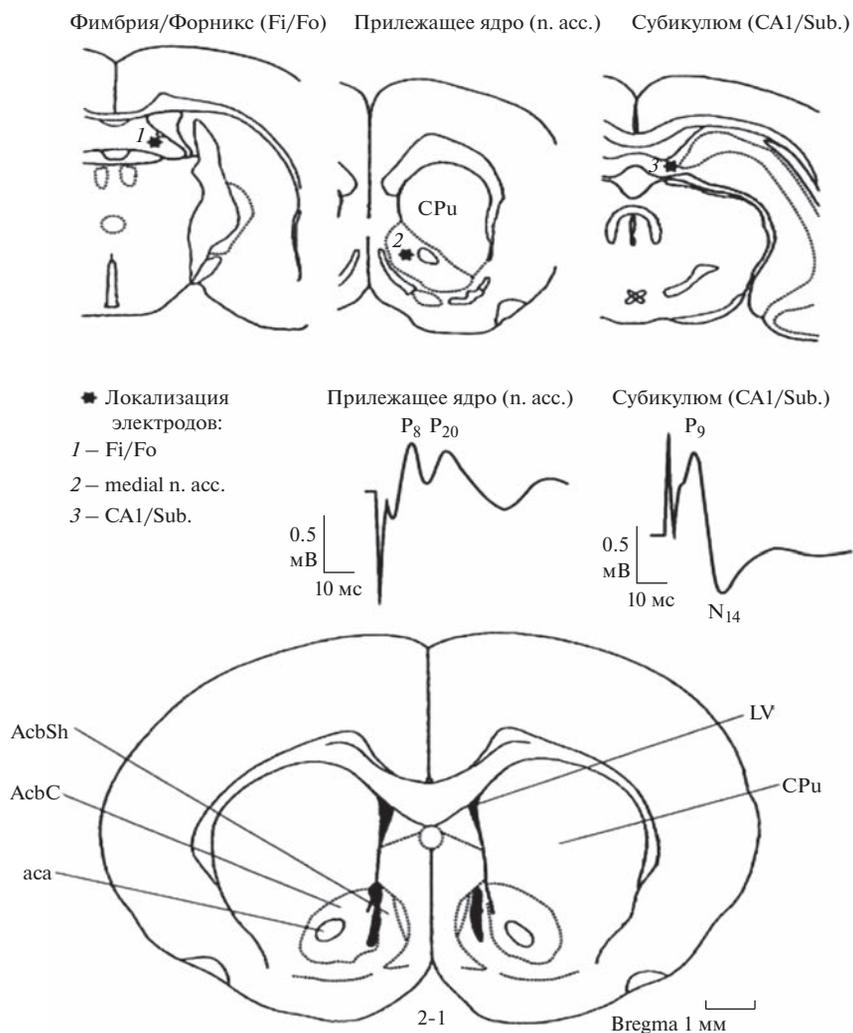


Рис. 1. В верхней части рисунка: схематическое изображение процедуры регистрации фокальных потенциалов в медиальном отделе прилежащего ядра при электрической стимуляции проводящей системы гиппокампа fimbria-fornix (1); medial n. acc. (2); CA1/Sub. (3). Звездочками отмечена локализация электродов. В средней части рисунка: характерный паттерн вызванного ответа в медиальном отделе прилежащего ядра n. accumbens и в субикулярной области CA1/subiculum, где P₈, P₉, P₂₀ – положительные и N₁₄ – отрицательный компоненты вызванного ответа. В нижней части рисунка: локализация электрических повреждений в медиальном отделе (AcbSh) прилежащего ядра (крыса 2-1). AcbSh – медиальный отдел n. acc. (medial shell part); AcbC – латеральный отдел n. acc. (core part); aca – передняя комиссура (anterior commissure); LV – латеральные желудочки (lateral ventricle); CPu – каудато-путамен (caudate-putamen). Фронтальные планы срезов мозга соответствуют координате 1.0 мм от брегмы (по: Paxinos, Watson, 2013, с изменениями).

pix) за исключением введения в прилежащее ядро регистрирующего (электролитического) электрода. После операции рану зашивали и животных содержали в изолированных клетках под наблюдением экспериментатора, а также проводили поведенческие исследования. Через 4–5 недель животных под глубоким нембуталовым наркозом проводили транскраниальную перфузию 4%-ным раствором формальдегида в фосфатном буфере. Гистологические срезы мозга изготавливали на замораживающем микротоме и окрашивали крезил-виолетом, для более точной оценки локализации и размера повреждений использовали также нейрогистохимическое окрашивание с помо-

щью маркера-протеина NeuN. При верификации срезов мозга к области повреждения относили лишь участки ядра, не содержавшие сохранившихся тел нервных клеток.

Гистологическое исследование мозга оперированных животных показало, что используемый нами метод электрофизиологического контроля местоположения электродов обеспечил у всех подопытных крыс компактные селективные повреждения в медиальном отделе прилежащего ядра, которые были локализованы в центре тестируемого образования и его периферийной области, граничащей с латеральным отделом n. accumbens.

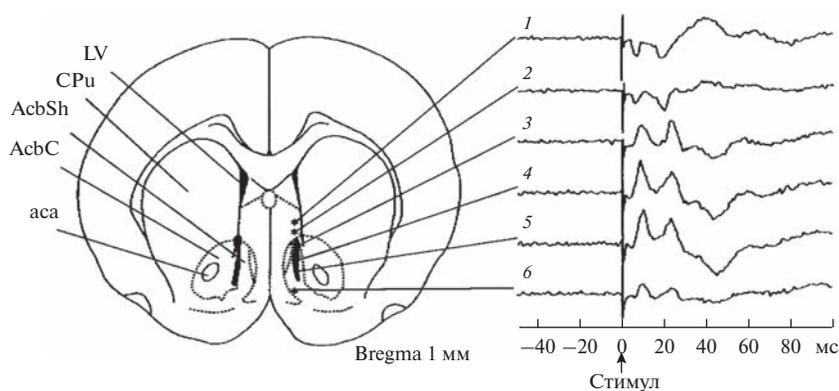


Рис. 2. Реконструкция маркирующих повреждений *n. accumbens* и соответствующие этим точкам фокальные потенциалы при последовательном перемещении электрода в трек у одной из подопытных крыс. 3, 4, 5 – последовательные отведения с регистрацией двухфазного положительного вызванного ответа, соответствующие точкам электролитического разрушения *n. acc.* На рисунке представлены усредненные (10 ответов) значения вызванных потенциалов. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ И ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ МЕДИАЛЬНОГО ОТДЕЛА ПРИЛЕЖАЩЕГО ЯДРА

На рис. 2. представлены реконструкция маркирующих повреждений ядра и соответствующие этим точкам фокальные потенциалы при последовательном перемещении электрода в трек у одной из подопытных крыс. Фронтальный план среза соответствует координате 1.0 мм от брегмы (Paxinos, Watson, 2013).

В отведениях 3, 4 и 5 показаны усредненные вызванные ответы с двухфазным положительным потенциалом с пиковой латентностью 8 и 20 мс. В отведении 6 эти ответы резко редуцированы, что соответствует локализации кончика электрода в вентральной области прилежащего ядра. В отведениях 1 и 2 указанные ответы практически отсутствуют, так как электрод находится выше проекционной зоны гиппокампа или выходит за пределы прилежащего ядра (рис. 2).

Анализ поведенческих нарушений, которые были выявлены нами у крыс с электролитическими повреждениями прилежащего ядра, выполненными при использовании электрофизиологического контроля (Альбертин, Винер, 2014; Wiener et al., 2003; Albertin, Wiener, 2015), показал, что сравнительно небольшие электролитические повреждения ядра приводили к более выраженным и однозначным нарушениям, по сравнению с нейрохимическими повреждениями прилежащего ядра, выявленными в других исследованиях (Seamans, Phillips, 1994). Это объясняется тем, что область повреждений в наших опытах топографически точно соответствовала зоне афферентных входов гиппокампальных, а также амигдалярных проек-

ций, которые конвергируют на одни и те же нейроны медиального отдела прилежащего ядра (Groenewegen et al., 1999).

Таким образом, в отличие от нейрохимических повреждений прилежащего ядра, вызванных инъекцией нейротоксинов (Bowman, Brown, 1998), электролитические повреждения в наших опытах обеспечивали выключение не только клеточных тел, но и афферентных проекций, поступающих в тестируемое ядро. Следует отметить, что из восьми животных, составляющих однородную подопытную группу крыс (имеющих одинаковый возраст и вес), реальные значения координат, определенные электрофизиологически и соответствующие точному повреждению тестируемой (*medial shell part*) области ядра, совпадали у пяти крыс, но лишь у одного животного из группы их значения соответствовали координатам данной области прилежащего ядра, рассчитанным по атласу мозга крысы (Paxinos, Watson, 2013). Таким образом, есть основания полагать, что, наряду с методикой индивидуального электрофизиологического контроля, обеспечивающего в 100% случаев точную локализацию электрода, при наличии большой однородной группы подопытных животных определение точных координат путем электрофизиологического картирования можно проводить в пилотных исследованиях на ограниченном количестве животных и затем использовать полученные значения координат для процедуры выключения тестируемой области мозга у всей группы животных, не прибегая к регистрации вызванных потенциалов у остальных животных. Однако точность повреждений в указанном случае может быть несколько ниже, по сравнению с индивидуальным картированием каждого животного группы. Для обеспечения хороших результатов при пилотном картировании необходимо следить за соблюдением одинаковых условий

проведения операции и процедуры прижигания (фиксация головы животного, схема определения референтных точек, использование одной и той же техники и оборудования, последовательности операции и т.д.), обязательных для всех оперируемых животных.

В заключение остановимся на процедуре гистологической оценки места и размера повреждения мозговой ткани, которую после завершения экспериментов традиционно окрашивают по методу Ниссля с использованием крезил-виолета (cresyl-violet) или тионина (thionin). Следует отметить, что применение метода Ниссля при окраске некоторых мозговых структур, включая прилежащее ядро, может давать неточные результаты. В первую неделю после операции зона электролитического повреждения ядра идентифицируется как хаотическое нагромождение коагулированных нейронов и их остатков с активной пролиферацией глиальных клеток, направленной на очистку зоны повреждения от разрушенных клеточных тел. Поведенческие исследования обычно занимают несколько недель от операции до гистологического контроля. В этот период в месте разрушения завершается процесс очистки и заполнения глиальными клетками зоны повреждения. В результате этого процесса оценка места и зоны компактного повреждения становится трудной задачей, так как при окраске по Ниссля бывает трудно отличить нейроны малого размера от замещающих их глиальных клеток. В этом случае мы рекомендуем в дополнение к методике Ниссля использовать нейрогистохимическое окрашивание с помощью маркер-протеина NeuN для более точной оценки локализации и размера повреждения. Этот протеин обнаружен в ядре и клеточных телах большинства нейронов головного мозга (за исключением клеток Пуркинье мозжечка, митральных клеток обонятельной луковицы и фоторецепторных клеток сетчатки), но отсутствует в глиальных клетках (Mullen et al., 1992; Guselnikova, Korzhevskiy, 2015; Duan et al., 2016). Таким образом, после инъекции протеина зона повреждения точно определяется по отсутствию данного маркера на месте разрушенных клеточных тел.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В статье рассмотрены возможности альтернативных способов определения локализации малоразмерных клеточных образований мозга у животных.

Применение разработанного нами инновационного метода картирования мозга путем регистрации вызванных потенциалов позволяет определить преимущества электрофизиологического подхода, используемого при локализации тестируемых ядерных структур мозга, при их селективном повреждении и при последующей гистологической

верификации места и размера повреждения мозговой ткани с использованием маркер-протеина NeuN. Предложены методические рекомендации, которые обеспечивают более точное определение координат тестируемых структур мозга, а также приводят к значительному сокращению и времени на проведение запланированных исследований, и затрат на их выполнение за счет отсутствия необходимости включения в опыт большого количества животных, что имеет практическое значение при проведении экспериментальных исследований в биологии и медицине.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит проф. А. Бертоза (A. Berthoz) за приглашение провести экспериментальные исследования в Лаборатории физиологии восприятия и двигательной активности Национального центра научных исследований Франции (Laboratoire de physiologie de la perception et de l'activité motrice, Centre national de la recherche scientifique, France) и доктора Н. Кенеш'дю (N. Quenech'du) (Centre national de la recherche scientifique, France) за ознакомление с методикой использования нейрохимического маркер-протеина NeuN для окрашивания гистологических препаратов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследования проведены в лаборатории физиологии высшей нервной деятельности Института физиологии им. И.П. Павлова РАН и лаборатории физиологии восприятия и двигательной активности (LPPA, CNRS, France). Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2014–2021 гг. (ГП-14, раздел 3).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии какого-либо конфликта интересов с администрацией и сотрудниками Национального центра научных исследований Франции (CNRS, France) при выполнении и обсуждении полученных автором результатов вышеописанного исследования.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием животных, соответствуют этическим стандартам институционального и/или Национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Альбертин С.В. Способ моделирования патологии проводящих путей гиппокампа // Бюл. изобр. 2005. № 23 (2 ч.). С. 415. Патент РФ № 2258961.
- Альбертин С.В. Этика физиологического эксперимента // Успехи физиол. наук. 2014. Т. 45. № 4. С. 99–110.
- Альбертин С.В., Винер С.И. Нейрональная активность прилежащего ядра и гиппокампа у крыс при формировании поискового поведения в радиальном лабиринте // Бюл. exper. биол. мед. 2014. Т. 158. № 10. С. 400–405.
- Альтман Я.А., Марусева А.М. Методика отведения потенциалов от различных отделов слуховой системы кошки в хронических условиях эксперимента // Физиол. журн. СССР им. И.М. Сеченова. 1959. Т. 45. № 6. С. 724–729.
- Мецкерский П.М. Стереотаксический метод. Применение в эксперименте и клинике. М.: Медгиз, 1961. 203 с.
- Albertin S.V., Wiener S.I. Neuronal activity in the nucleus accumbens and hippocampus in rats during formation of seeking behavior in a radial maze // Bull. Exp. Biol. Med. 2015. V. 158 (4). P. 405–409.
- Beijer A.V.J., Witter M.P., Groenewegen H.J. Relationships of hippocampal and amygdaloid inputs to the nucleus accumbens with outputs to the mesencephalic locomotor region in the rat // Eur. J. Neurosci. 1994. Suppl. 7. P. 209.
- Bowman E.M., Brown V.J. Effects of excitotoxic lesions of the rat ventral striatum on the perception of reward cost // Exp. Brain Res. 1998. V. 123. № 4. P. 439–448.
- Duan W., Zhang Y.P., Hou Z. et al. Novel insight into NeuN: from neuronal marker to splicing regulator // Mol. Neurobiol. 2016. V. 53 (3). P. 1637–1647.
- Freeman W.J. Distribution in time and space of prepyriform electrical activity // J. Neurophysiol. 1959. V. 22. P. 644–665.
- Groenewegen H.J., Mulder A.B., Beijer A.V.J. et al. Hippocampal and amygdaloid interaction in the nucleus accumbens // Psychobiology. 1999. V. 27. P. 149–164.
- Gusel'nikova V.V., Korzhevskiy D.E. NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker // Acta Naturae. 2015. V. 7 (2). P. 42–47.
- Jasper H.H., Ajmone-Marsan C.A. Stereotaxic atlas of the diencephalon of the cat. Ottawa: National Research Council of Canada, 1954. 242 p.
- Jongen-Relo A., Voorn P., Groenewegen H.J. Immunohistochemical characterization of the shell and core territories of the nucleus accumbens in the rat // Eur. J. Neurosci. 1994. V. 6. № 8. P. 1255–1264.
- Kodsi M.H., Swerdlow N.R. Reduced prepulse inhibition after electrolytic lesions of nucleus accumbens subregions in the rat // Brain Res. 1997. V. 773. № 1–2. P. 45–52.
- Li Z., Zhang J.-G., Ye Y., Li X. Review on factors affecting targeting accuracy of deep brain stimulation electrode implantation between 2001 and 2015 // Stereotact. Funct. Neurosurg. 2016. V. 94 (6). P. 351–362.
- Liu H., Zhou J., Tian W. et al. DNA methylation atlas of the mouse brain at single-cell resolution // Nature. 2021. V. 598 (7879). P. 120–128.
- Miyamoto M., Saji Y., Nagawa Y. Behavioral changes following lesioning of the nucleus accumbens (ACB) and effects of centrally acting drugs in rats // Nippon Yakurigaku Zasshi. Fol. Pharmacol. Jpn. 1980. V. 76. P. 227–238.
- Mulder A.B. Interaction of inputs and synaptic plasticity in the nucleus accumbens. An *in vivo* electrophysiological study in the rat. PhD thesis. Amsterdam, 1996.
- Mullen R.J., Buck C.R., Smith A.M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates // Development. 1992. V. 116. № 1. P. 201–211.
- Parkinson J.A., Olmstead M.C., Burns L.H. et al. Dissociations in effects of lesions of the nucleus accumbens core and shell on appetitive Pavlovian approach behavior and the potentiation of conditioned reinforcement and locomotor activity by D-amphetamine // J. Neurosci. 1999. V. 19. № 6. P. 2401–2411.
- Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 7rd ed. San Diego: Academic Press, 2013. 480 p.
- Pellegrino L.J., Pellegrino A.S., Cushman A.J. A stereotaxic atlas of the rat brain. 2nd ed. N.Y., L.: Plenum press, 1979. 23 p.
- Seamans J.K., Fillips A.G. Selective memory impairments produced by transient lidocaine-induced lesion of nucleus accumbens in rats // Behav. Neurosci. 1994. V. 108. P. 456–468.
- Sedrak M., Alaminos-Bouza A.L., Srivastava S. Coordinate systems for navigating stereotaxic space: how not to get lost // Cureus. 2020. V. 12 (6). P. e8578. <https://doi.org/10.7759/cureus.8578>
- Sutherland R.J., Rodriguez A.J. The role of the fornix/fimbria and some related subcortical structures in place learning and memory // Behav. Brain Res. 1989. V. 32. P. 265–277.
- Wang Q., Ding S.-L., Li Y. et al. The allen mouse brain common coordinate framework: a 3D reference atlas // Cell. 2020. V. 181 (4). P. 936–953.
- Wiener S.I., Shibata R., Tabuchi E. et al. Spatial and behavioral correlates in nucleus accumbens neurons in zones receiving hippocampal or prefrontal cortical inputs // Int. Congr. Ser. 2003. V. 1250. P. 275–292.
- Zahm D.S., Brog J.S. On the significance of subterritories in the “accumbens” part of the rat ventral striatum // Neuroscience. 1992. V. 50. № 4. P. 751–767.
- Zahm D.S., Heimer L. The efferent projections of the rostral pole of the nucleus accumbens in the rat: comparison of the rostral pole projection patterns with those of the core and shell // J. Comp. Neurol. 1993. V. 327. № 2. P. 220–232.

Stereotaxic Method of Brain Loci Localization: The Alternative Approaches

S. V. Albertin*

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

**e-mail: albertinsv@infran.ru*

The article discusses the possibilities of the alternative methods for determining the localization of small-sized brain cell formations in animals. The advantages of the electrophysiological approach used in localization of the tested nuclear structures of the brain, their selective damage and subsequent histological verification of the location and size of the damage to the brain tissue are shown. Methodological recommendations are proposed that provide an error-free determination of the coordinates of the tested brain structures, which leads to a significant reduction in the time for conducting planned studies and the costs of their implementation due to the absence of the need to include a large number of animals in the experiment.

Keywords: electrophysiological mapping of the brain, localization of structures, their damage and histological verification

УДК 616.1-07

БЫСТРАЯ ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ С ПОМОЩЬЮ КАРДИОРЕСПИРАТОРНЫХ ИНДЕКСОВ

© 2023 г. Ек. Н. Мокашева¹, *, Ев. Н. Мокашева¹,
И. В. Гребенникова¹, В. А. Земскова¹, В. И. Болотских¹

¹Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

*e-mail: mockasheva.vrn@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.09.2022 г.

После доработки 14.10.2022 г.

Принята к публикации 27.10.2022 г.

Сердечно-сосудистая патология является лидирующей среди всех нозологий по распространенности и смертности, превалируя в пожилом возрасте. Необходима быстрая оценка работы сердечно-сосудистой системы в практике врача-клинициста, особенно на амбулаторном этапе. Существует ряд индексов и коэффициентов, которые возможно рассчитать на основании общего осмотра (без финансовых затрат), а именно: индексы Кердо, Робинсона и Хильдебрандта, пульсовое давление, коэффициент выносливости, адаптационный потенциал по Баевскому, фактический индекс кровоснабжения, тип саморегуляции кровообращения, ударный объем сердца, коэффициент экономичности кровообращения, уровень физического состояния. В статье приводятся формулы, их расшифровка и возможные варианты интерпретации результатов кардиореспираторных индексов.

Ключевые слова: индекс Кердо, индекс Робинсона, пульсовое давление, индекс Баевского, коэффициент выносливости, индекс Хильдебрандта

DOI: 10.31857/S0042132423020072, **EDN:** KMGQMJ

ВВЕДЕНИЕ

По показателю смертности сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) продолжают стабильно занимать первое место среди других болезней. Поэтому оценка работы сердечно-сосудистой системы (ССС) остается приоритетом в практике врача-клинициста. В связи с этим особенности и характеристики вышеуказанной патологии на данный момент являются одним из актуальных направлений научных исследований в медицине. Одни авторы рассматривают место молекулярных исследований в диагностике заболеваний сердца и сосудов (Dorobantu et al., 2021), другие – исследуют роль мембранных везикул в развитии атеросклеротических процессов при сердечно-сосудистой патологии (Nafiane, Daskalopoulou, 2018; Rezaie et al., 2019). Общим в подобных исследованиях является достаточно высокая цена, необходимость в дополнительном оборудовании для проведения анализа и наличие специально обученного персонала, который будет осуществлять диагностику. Этот процесс весьма трудоемкий и времязатратный, дорогостоящий, не всегда доступен для врача-клинициста и самого пациента. В то же время существует ряд индексов и коэффициентов, которые оценивают функциональные возможности жизнеобеспечивающих систем (дыхательной и СССР). Данные по-

казатели возможно рассчитать на основании общего осмотра, что не несет дополнительных временных и финансовых затрат. Эти же индексы можно использовать как фундамент для специальных методов обследования, задача которых – выявление патологии с латентным течением. Профилактика и ранняя диагностика болезней – наиболее важные проблемы в развитии клинической медицины.

Целью данной статьи стал обзор следующих показателей, которые можно использовать для оценки работы жизнеобеспечивающих систем: вегетативный индекс Кердо, индекс Робинсона, пульсовое давление, коэффициент выносливости, адаптационный потенциал по Баевскому, фактический индекс кровоснабжения, тип саморегуляции кровообращения, ударный объем сердца, коэффициент экономичности кровообращения, уровень физического состояния, индекс Хильдебрандта.

ХАРАКТЕРИСТИКА ИНДЕКСОВ

Вегетативный индекс Кердо (ВИК) отражает состояние вегетативной нервной системы и ее воздействие на сердце и сосуды (Духова, 2014). Рассчитывают индекс по следующей формуле:

$$\text{ВИК} = (1 - (\text{ДАД}/\text{ЧСС})) \times 100,$$

где ДАД – диастолическое артериальное давление, ЧСС – частота сердечных сокращений (Иванов и др., 2017). Здесь и далее в формулах учитываются именно количественные (безразмерные) значения. Если величина данного показателя равна нулю, то можно говорить о равновесии (эйтонии) между парасимпатикой и симпатикой. При преобладании воздействия парасимпатической нервной системы (ваготонии) вышеуказанный индекс отрицателен, а при преобладании влияния симпатической (симпатикотонии) – положителен (Чердниченко Н.Л., Чердниченко Л.П., 2015). Ваготония проявляется в склонности к брадикардии, головным болям, головокружениям, обморочным состояниям и субфебрилитету. Симпатикотония часто проявляется в виде тахикардии и повышения артериального давления. Инфекционные процессы при данном изменении вегетативного статуса протекают с высокой температурой (Айзман и др., 2020).

Индекс Робинсона (ИР) определяет энергетический потенциал организма, он характеризует уровень кислорода, который потребляет сердечная мышца: данный показатель возрастает при увеличении использования кислорода миокардом и снижается – при уменьшении (Этенко и др., 2013). Так можно оценить систолическую работу сердца. Индекс рассчитывают, используя количественные значения ЧСС и САД – систолического артериального давления – в следующей формуле:

$$\text{ИР} = \text{ЧСС} \times \text{САД}/100.$$

Отметим, что традиция в интерпретации ИР сложилась следующая. Высокими считают значения $\text{ИР} < 70$, они характеризуют состояние ССС как отличное. Показатели выше среднего (70–85) и средние (85–95) указывают, что работа сердца и сосудов происходит в пределах нормы. Но стоит отметить, что даже в случае оценки показателя как средний, может обнаруживаться недостаточность функционирования ССС. Подобные изменения не проявляются в покое, но при повышенной физической нагрузке могут продемонстрировать себя снижением выносливости из-за недостаточного снабжения сердечной мышцы кислородом. Значения ИР ниже среднего (95–110) указывают на нарушение регуляции деятельности ССС: из-за дисбаланса в поставке кислорода в сердце изменяются не только обменные процессы в кардиомиоцитах, но и иннервация сердечной мышцы, что может проявляться в нарушении ее проводимости. При существенно пониженных значениях ИР (≥ 110) данный показатель свидетельствует о серьезных нарушениях регуляции данной системы, вплоть до развития ишемической болезни сердца (ИБС) и инфаркта миокарда из-за гипоксических нарушений в кардиомиоцитах (Прокопьев и др., 2014; Иванов и др., 2017).

Мониторинг ВИК и ИР можно использовать во время и после физической нагрузки у пациентов с ИБС, проходящих программу реабилитации. Указанные параметры в этом случае дают информацию о функциональных возможностях сердечной мышцы в ходе физической нагрузки, а также о восстановлении ССС (Zharska et al., 2021).

При изменении значений ВИК в ходе лечения или реабилитации в сторону нулевых можно говорить о нормотонии или восстановлении баланса между симпатической и парасимпатической вегетативными системами. Увеличение показателя в положительную или отрицательную сторону свидетельствует о неблагоприятном воздействии лечебных мероприятий на состояние вегетативного отдела нервной системы и преобладании симпатки или парасимпатки, что может усугубить течение уже имеющейся у пациента патологии.

Значения ИР при благоприятном ходе лечения должны изменяться в меньшую сторону. Рост данного коэффициента в цифровом эквиваленте указывает на недостаточное снабжение кислородом миокарда и расценивается как неудовлетворительный результат проводимой терапии.

Пульсовое давление (ПД), характеризуя состояние ССС, может отображать наличие патологических изменений, связанных с жесткостью стенок сосудов, с клапанами сердца, со щитовидной железой (Вахмистрова и др., 2022). Для определения ПД применяется формула (Тарабрина и др., 2018):

$$\text{ПД} = (\text{САД} - \text{ДАД}).$$

Нормальные значения данного показателя в среднем равны 25–30% от величины ДАД (Духова, 2014). Норма ПД находится в следующих границах: 35 ± 10 мм рт. ст. ПД выше 60 может свидетельствовать об атеросклеротическом поражении стенок сосудов, а также о сердечной недостаточности (Бекмуратова, Хайдаров, 2022). Высокие значения данного показателя среди лиц мужского пола могут быть прогностическими факторами развития осложнений со стороны ССС как при наличии артериальной гипертензии, так и при отсутствии этого заболевания. У женщин подобных закономерностей выявить не удалось: то есть ПД в данной группе больных не будет являться индикатором повышенного риска ССЗ (Venetos et al., 1998). Кроме того, обнаружена связь высоких значений ПД с массой тела и симптомами синдрома инсулинорезистентности среди детей 8–18 лет вне зависимости от пола (Кожевникова и др., 2015). Выявлено, что у детей, которые имеют избыточную массу тела и повышенный уровень инсулина, отмечаются более высокие цифры САД, а следовательно, и ПД (Jiang et al., 1995). Имеется прямая связь между ПД, САД, ДАД и риском смерти от ССЗ: увеличение ПД говорит о повышенной жест-

Таблица 1. Возрастные нормы для фактического индекса кровоснабжения

| Возраст | 1–10 | 10–20 | 20–30 | 30–40 | 40–50 | 50–60 | 60–70 | 70–80 | 80–90 |
|-----------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Норма ИКф | 144–89 | 89–73 | 73–65 | 65–57 | 57–52 | 52–44 | 44–46 | 46–47 | 47–48 |

кости артерий, которая в свою очередь снижает показатели ДАД.

Коэффициент выносливости (КВ) определяет функциональное состояние ССС, а также помогает определить уровень тренированности данной системы на фоне физической нагрузки (Духова, 2014). КВ высчитывают по формуле Кваса (Тулякова и др., 2021):

$$КВ = ЧСС \times 10 / ПД.$$

Это объединенный показатель, сочетающий в себе ЧСС с ПД. Нормальные значения в данном случае 12–16 (Иванов и др., 2017). При получении подобных значений обследуемый допускается к тренировкам с силовыми и скоростно-силовыми нагрузками. Если показатель выше 16, то работа ССС ослаблена, а если ниже 12 – усилена. Пациентам с КВ 16 и выше следует избегать силовых и скоростных нагрузок на тренировках, отдавая предпочтение дыхательной гимнастике и упражнениям в аэробном режиме. КВ ниже 12 свидетельствует о хорошей работе ССС. Подобные результаты чаще всего встречаются у людей, которые занимаются спортом и, как правило, хорошо переносят нагрузки различной интенсивности. Зная цифры КВ обследуемого, врач может давать рекомендации по занятиям физической культурой и контролировать развитие выносливости во время тренировок (Александров, 2016).

Для вычисления адаптационного потенциала (АП) системы кровообращения, отражающего функциональные возможности организма приспособляться к изменениям характеристик окружающей среды, которые включают в себя следующие параметры: температуру, давление, а также всевозможные физические и психоэмоциональные нагрузки, которым подвержены все участники современного социума, – используют формулу Баевского:

$$АП = 0.011ЧСС + 0.014САД + 0.008ДАД + 0.009MT - 0.009P + 0.014B - 0.27,$$

где МТ – масса тела (кг), Р – рост (см), В – возраст (годы) (Тулякова и др., 2021). Интерпретировать показатели АП можно следующим образом. Значения ниже 2.6 констатируют удовлетворительную адаптационную способность (Духова, 2014), что говорит о достаточных функциональных возможностях ССС. При АП ≥ 2.6 : чем выше показатели, тем ниже функциональные способности ССС и больше вероятность срыва адаптационных механизмов. При АП = 2.6–3.1 определяют напряжение механизмов адаптации. При

АП = 3.1–3.59 адаптация оценивается как неудовлетворительная. Показатели ≥ 3.6 интерпретируют как срыв адаптации и снижение функциональных резервов системы кровообращения, что в свою очередь неблагоприятно сказывается на адаптивных возможностях всего организма (Казакова и др., 2018). Стоит отметить, что АП часто используют для оценки уровня здоровья при занятиях спортом (Прокопьев и др., 2018).

Фактический индекс кровоснабжения (ИКф) рассчитывают по формуле Старра (Домрачев, Домрачева, 2017):

$$ИКф = (100 + 0.5ПД - 0.6ДАД - 0.6В) \times ЧСС / МТ.$$

ИКф отражает гемодинамику организма. Согласно данному показателю можно определить биологический возраст (Кучеренко, Беляков, 2018). Норма индекса варьирует в зависимости от возрастных границ (табл. 1).

Снижение данного показателя относительно нормальных значений свидетельствует о том, что ССС обследуемого не соответствует возрастным критериям. Подобный результат можно интерпретировать как преждевременное старение организма. Индекс выше нормальных значений, характерных для возраста обследуемого, также говорит о несоответствии его паспортного возраста биологическому, но в данном случае организм пациента стареет медленнее, что является положительным фактором. Подобные пациенты лучше переносят оперативные вмешательства и быстрее восстанавливаются после различных медицинских манипуляций и после заболеваний.

Установленный тип саморегуляции кровообращения (ТСК) позволяет судить о том, как организм расходует резервы ССС на обеспечение тока крови по сосудам (Хвостова, 2012). Данный показатель рассчитывается по следующей формуле (Мельник, Мельник, 2019):

$$ТСК = (ДАД / ЧСС) \times 100.$$

Выделяют три типа ТСК: < 90 – сердечный тип; 90–110 – сердечно-сосудистый; > 110 – сосудистый (Катульская и др., 2014). Обследуемые с сосудистым типом регуляции имеют высокий и экономичный уровень функциональности ССС. Их хорошая адаптация к продолжительному стрессу связана с преобладанием парасимпатических влияний и с усиленной сократительной активностью миокарда. Люди с сердечным типом, напротив, имеют напряженность в функционировании

сердца и сосудов. В данном случае лучше формируется адаптация к кратковременным изменениям окружающей среды, чем к длительным. Сердечный ТСК является наименее оптимальным среди всех трех типов, так как даже в состоянии покоя обследуемые имеют высокую ЧСС, что связано с повышением активности симпатической нервной системы (Гречкина, 2016). Естественно, что при длительных нагрузках поддержание высокого уровня функционирования организма с сердечным ТСК требует большого расходования энергии и может привести к срыву адаптационных возможностей организма, что, в свою очередь, снизит работоспособность и выносливость пациента. Обследуемые с сердечно-сосудистым типом имеют наиболее приемлемый ТСК в плане регуляции работы ССС, которая у них обеспечивается балансом между сердечным и сосудистым компонентами гемодинамики (Гречкина, 2018; Мельник, Мельник, 2019).

Величину ударного объема сердца (УОС) используют для оценки насосной функции сердца и уровня доставки кислорода тканям. Для его расчета можно использовать формулу Старра, которую он предложил в 1954 г.:

$$\text{УОС} = 90.97 + 0.54\text{ПД} - 0.57\text{ДАД} - 0.61\text{В}.$$

Однако значения, которые были получены с помощью данной формулы, часто сравнивали с результатами, установленными при помощи других методов исследования (методы Грольмана, Фика). Показатели УОС, полученные разными методами, отличались друг от друга (Заболотских и др., 2002). Чтобы повысить точность показателей УОС, в данную формулу предложено ввести согласующий коэффициент k , который связан с изменениями актуальных значений ЧСС и ПД. При ЧСС 60–90 ударов в минуту и при ПД 25–49 мм рт. ст. $k = 1.64$. Но если ПД 50–74 мм рт. ст. или 75–100 мм рт. ст. (при тех же значениях ЧСС, что указаны выше), то k равен 1.75 и 1.4 соответственно. В результате была предложена следующая модифицированная формула Старра:

$$\text{УОС} = (90.97 + 0.54\text{ПД} - 0.57\text{ДАД} - 0.61\text{В}) \times k.$$

Нормальные значения УОС находятся в пределах 55–75 (Тарабрина и др., 2018). Повышение данного показателя может в норме наблюдаться у профессиональных спортсменов и лиц, активно занимающихся физической культурой. Значения УОС ниже нормы могут свидетельствовать о снижении насосной функции сердца и о развитии иных патологических процессов. Причиной данных нарушений со стороны сердца могут выступать врожденные и приобретенные пороки сердца, ИБС, нарушения ритма. К внесердечным причинам относят сахарный диабет и интоксикации различной этиологии (Gorgels, 1997).

Коэффициент экономичности кровообращения (КЭК) рассчитывают по формуле (Тулякова и др., 2021):

$$\text{КЭК} = (\text{САД} - \text{ДАД}) \times \text{ЧСС}.$$

Норма КЭК – 2500–3000.

Повышение значений этого индекса говорит о более экономном расходовании резервов ССС, а также может свидетельствовать об утомлении (Перельгина, Петракова, 2015). Примером может служить повышение данного показателя у юных тхэквондистов к концу соревновательного периода, по сравнению со значениями КЭК, которые были зафиксированы в начале соревнований. Это свидетельствует о напряжении физиологических механизмов при работе ССС, а также о возрастании ее утомления (Сарайкин и др., 2016). Установлено, что КЭК возрастает у абитуриентов и студентов перед экзаменом. Стресс в данном случае формировал перестройку деятельности ССС, сопровождающуюся усиленным расходованием резервов организма (Фомягина, Свешников, 2005). Изменения в значениях КЭК отмечены у студентов профессионального лица во время производственной практики. И в этом случае данный коэффициент превышал норму, что свидетельствовало о напряженном функционировании ССС учащихся в процессе трудового обучения и непосредственно труда (Воронина, 2016). Значения КЭК выше нормы также регистрировались у студентов медицинского университета, что предположительно связывают с особенностями обучения в медицинском вузе (Антонова и др., 2022; Мокашева и др., 2022).

Снижение данного показателя свидетельствует о неблагоприятных изменениях в функционировании ССС, причиной которых могут выступать большое количество патологий, начиная от соматических болезней, в первую очередь кардиологических, и заканчивая внешними факторами, например переохлаждением или травмой с обильной кровопотерей. В любом случае нужно отталкиваться от анамнеза конкретного пациента и проводить все необходимые дополнительные обследования для установления причины изменений со стороны работы внутренних органов.

Для оценки уровня физического состояния (УФС) применяют следующую формулу, предложенную Е.А. Пироговой в 1985 г. (Душанин и др., 1985):

$$\text{УФС} = (700 - 3\text{ЧСС} - 2.5\text{АД}_{\text{ср}} - 2.7\text{В} + 0.28\text{МТ}) / (350 - 2.6\text{В} + 0.21\text{Р}),$$

где: $\text{АД}_{\text{ср}}$ – среднее артериальное давление (определяется как сумма диастолического давления и 1/3 разности между систолическим и диастолическим давлением). Уровень физического состояния анализируется в зависимости от пола. Выделя-

Таблица 2. Уровни физического состояния у мужчин и женщин (по: Гребенчук и др., 2016)

| Уровень | Низкий | Ниже среднего | Средний | Выше среднего | Высокий |
|---------|-------------|---------------|-------------|---------------|---------|
| Мужчины | 0.225–0.375 | 0.376–0.525 | 0.526–0.675 | 0.676–0.825 | > 0.826 |
| Женщины | 0.157–0.260 | 0.261–0.365 | 0.366–0.475 | 0.476–0.575 | > 0.576 |

ют пять уровней физического состояния для мужчин и женщин (табл. 2).

Необходимо отметить, что метод оценки УФС с помощью вышеуказанной формулы Е.А. Пирогова предлагала использовать у практически здоровых лиц с нормальной массой тела или превышающей должны значения не более чем на 15%. При низком и ниже среднего УФС физическая работоспособность находится на уровне 50–75% от должной величины, практически на границе между нормой и патологией. Также в данном случае высок риск формирования ИБС. Однако у лиц с подобными значениями какие-либо отклонения от физиологической нормы определяются только при физической нагрузке. Средние значения УФС определяются при понижении физической работоспособности до 76–90% от должной величины. В этом случае функциональные возможности жизнеобеспечивающих систем (в первую очередь ССС) ограничены. При показателях выше среднего функциональные резервы и двигательная подготовленность почти соответствуют оптимальным параметрам по возрасту и полу. Самые лучшие функциональные возможности определяются у лиц с высокими значениями УФС, показатели физической работоспособности которых находятся в пределах нормальных параметров (однако нужно отметить, что эти показатели могут быть и выше нормы). Подобные высокие значения встречаются только у спортсменов, которые продолжительное время задействованы в специализированной мышечной деятельности с тренировочным эффектом. В данном случае риск формирования ИБС практически отсутствует или незначителен (Миллер, 2015).

Индекс Хильдебрандта (Q) используют для оценки межсистемного взаимодействия кардиологической и респираторной систем. Вычисляют данный показатель по формуле:

$$Q = \text{ЧСС} / \text{ЧДД},$$

где ЧДД – частота дыхательных движений. Норма Q – 2.9–4.8. Повышение или снижение данного индекса за пределы нормы может служить свидетельством рассогласованности в работе между дыхательной и ССС, что в свою очередь требует дополнительного обследования скрыто протекающей патологии внутренних органов. Данный индекс снижается у абитуриентов под воздействием экзаменационного стресса (Фомягина, Свешников, 2005). Возрастание индекса Хильдебрандта на фоне

снижения частоты дыхательных движений может служить основанием для отказа от интенсивной физической нагрузки (Классина, 2019). Также данный индекс можно использовать как критерий физиологических затрат спортсмена, осуществляющего этапно-дозированные физические нагрузки возрастающей интенсивности на велоэргометре (Фудин и др., 2011). По предложению А.А. Василькова, при занятиях спортом следует допускать нагрузки, которые формируют соотношение ЧСС/ЧДД в пределах 3.5–6.5, последующее же возрастание мощности физических нагрузок может привести к переутомлению спортсмена, перенапряжению кардиореспираторных систем, усилению обменных процессов и развитию состояния ацидоза (Васильков, 1995).

Наиболее простые индексы в использовании для врача-клинициста: пульсовое давление, тип саморегуляции кровообращения, коэффициент экономичности кровообращения и индекс Хильдебрандта. Данные показатели легко и быстро вычислить с помощью обычного калькулятора, потому что формулы, их описывающие, состоят из одного или двух действий. Остальные индексы сложнее в вычислении и могут потребовать использования дополнительных программ, средств и методик расчета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, используя вышеперечисленные кардиореспираторные индексы, можно не только быстро оценить работу сердечно-сосудистой системы и наметить план дальнейшего обследования, но и дать заключение о профпригодности или уровне возможных физических нагрузок для обследуемого.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ректору ВГМУ им. Н.Н. Бурденко И.Э. Есауленко за предоставление рекомендаций по написанию данной научной работы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья является литературным обзором научных работ, посвященных разбору описанных индексов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Айзман Р.И., Лебедев А.В., Айзман Н.И., Рубанович В.Б.* Комплексная оценка здоровья участников образовательного процесса. Учебное пособие для вузов по гуманитарным направлениям. М.: ЮРАЙТ, 2020. 207 с.
- Александров И.А.* Особенности развития специальной выносливости у лыжников-гонщиков 15–17 лет: выпускная квалификационная работа. Екатеринбург: РГППУ, 2016. 56 с.
- Антонова А.А., Яманова Г.А., Сайпулаева Н.С., Сайпулаева Л.С.* Анализ состояния сердечно-сосудистой системы студентов // *Международ. науч.-иссл. журн.* 2022. № 3-1 (117). С. 98–101.
- Бекмурадова М.С., Хайдаров С.Н.* Связь между повышенным пульсовым давлением и натрийуретическим пептидом // *Журн. кардиоресп. иссл.* 2022. Т. 3. № 1. С. 26–29.
- Васильков А.А.* Способ определения общего состояния организма. Патент № 2142733. Заяв. 19.12.1995. Оpubл. 20.12.1995.
- Вахмистрова Т.К., Харченко О.А., Балицкая Т.Н. и др.* Пульсовое давление у здоровых подростков // *Рос. кардиол. журн.* 2022. № 27 (S6). С. 6–7.
- Воронина И.Ю.* Состояние сердечно-сосудистой системы у студентов профессионального лица во время производственной практики // *Международ. науч.-иссл. журн.* 2016. № 3-3 (45). С. 8–11.
- Гребенчук М.В., Ларченко И.И., Кострыкина Е.Е.* Определение уровня физического состояния студентов биологического факультета // *Социальная защита и здоровье личности в контексте реализации прав человека: наука, образование, практика / Мат. междунар. науч.-практ. конф. (Минск, 26–27 ноября 2015).* Минск: БГУ, 2016. С. 565–570.
- Гречкина Л.И.* Донозологическая характеристика показателей гемодинамики у мальчиков – уроженцев города Магадана с разным типом саморегуляции кровообращения // *Здоровье насел. среда обит.* 2016. № 1 (274). С. 22–26.
- Гречкина Л.И.* Типологические особенности функционирования сердечно-сосудистой системы у подростков // *Гиг. санитар.* 2018. № 97 (10). С. 962–966.
- Домрачев А.А., Домрачева М.Я.* Экономичность функционирования сердечно-сосудистой системы как параметр функциональной физиологической оценки состояния организма в условиях психофизической активности // *Международ. журн. прикл. фундам. иссл.* 2017. № 5 (Ч. 1). С. 59–65.
- Духова Г.А.* Методика определения и оценка функционального состояния сердечно-сосудистой системы: методические указания. М.: МИИТ, 2014. 25 с.
- Душанин С.А., Иващенко Л.Я., Пирогова Е.А.* Тренировочные программы для здоровья. Киев: Здоров'я, 1985. 32 с.
- Заболотских И.Б., Станченко И.А., Скопец А.А.* Способ определения ударного объема сердца. Патент № 2186520. Заявл. 04.12.2000. Оpubл. 10.08.2002.
- Иванов С.А., Невзорова Е.В., Гулин А.В.* Количественная оценка функциональных возможностей сердечно-сосудистой системы // *Вестн. Тамб. унив. Ест. техн. науки.* 2017. Т. 22. № 6. С. 1535–1540.
- Казакова Г.Н., Панкова Е.С., Замкова Е.В. и др.* Конституциональная характеристика и функциональный статус первокурсников как критерий адаптации к обучению в вузе // *Соврем. пробл. науки образов.* 2018. № 6. С. 61.
- Катильская О.Ю., Ефимова Н.В., Тихонова И.В.* Сравнительная оценка функциональных возможностей сердечно-сосудистой системы подростков в зависимости от состояния верхних дыхательных путей // *Валеология.* 2014. № 1. С. 15–20.
- Классина С.Я.* Индекс Хильдебрандта как прогностический критерий отказа от интенсивной физической нагрузки // *Наука и спорт: соврем. тенденции.* 2019. Т. 7. № 2. С. 68–73.
- Кожевникова О.В., Намазова-Баранова Л.С., Логачёва О.С. и др.* Пульсовое артериальное давление и показатели ремоделирования сосудов: поиск ранних признаков развития сердечно-сосудистой патологии у детей // *Вопр. соврем. педиатр.* 2015. Т. 14. № 1. С. 119–123.
- Кучеренко К.Н., Беляков В.И.* Клинико-физиологический анализ адаптационного статуса системы кровообращения и рисков кардиоваскулярной патологии при различной выраженности коронарного поведения типа А // *Вестн. мед. инст. "РЕАВИЗ": реабилитация, врач и здоровье.* 2018. № 1 (31). С. 102–110.
- Мельник С.Н., Мельник В.В.* Особенности показателей сердечно-сосудистой системы студентов с различными типами саморегуляции кровообращения // *Пробл. здор. экол.* 2019. № 2 (60). С. 80–85.
- Мокашева Ек.Н., Мокашева Евг.Н., Гребенникова И.В.* Взаимосвязь аффективных расстройств, стресса, качества жизни и предрасположенности к патологии сердечно-сосудистой системы у студентов медицинского вуза // *Науч. обозр. Мед. науки.* 2022. № 6. С. 39–43.
- Миллер Л.Л.* Спортивная медицина: учебное пособие. М.: Человек, 2015. 184 с.
- Перельгина А.В., Петракова Т.В.* Влияние особенностей восприятия индивидуальной минуты на функциональное состояние сердечнососудистой системы учащихся 8 класса гимназии № 39 г. Орла // *Концепт.* 2015. № T25. С. 96–100.
- Прокопьев Н.Я., Колунин Е.Т., Гуртовая М.Н., Митасов Д.И.* Физиологические подходы к оценке функциональных нагрузочных проб в спорте // *Фунд. иссл.* 2014. № 2. С. 146–150.
- Прокопьев Н.Я., Губин Д.Г., Дуров А.М. и др.* Адаптационный потенциал по Р.М. Баевскому у мужчин юношеского возраста, занимающихся плаванием в ледяной воде // *Тюмен. мед. журн.* 2018. Т. 20. № 4. С. 25–29.
- Сарайкин Д.А., Павлова В.И., Камскова Ю.Г., Терзи М.С.* Интегративная деятельность организма при адаптации к физической нагрузке ациклической на-

- правленности в тхэквондо. Учебное пособие для студентов, спортсменов, тренеров и инструкторов. Челябинск: Цицеро, 2016. 60 с.
- Тарабрина Н.Ю., Грабовская Е.Ю., Тарабрина В.А., Абдураманов А.Р.* Выраженность основных показателей центральной кардиогемодинамики у борцов различной квалификации // Уч. записки Крым. фед. унив. им. В.И. Вернадского. Биол. Хим. 2018. Т. 4 (70). № 1. С. 92–103.
- Тулякова О.В., Авдеева М.С., Смирнова А.А.* Функциональное состояние студентов на первом году обучения // Нов. иссл. 2021. № 3. С. 40–45.
- Фомягина Н.В., Свешников А.А.* Вегетативные индексы у абитуриентов и студентов при экзаменационном стрессе // Соврем. наукоемк. технол. 2005. № 3. С. 103–104.
- Фудин Н.А., Судаков К.В., Хадарцев А.А. и др.* Индекс Хильдебрандта как интегральный показатель физиологических затрат у спортсменов в процессе возрастающей этапно-дозированной физической нагрузки // Вестн. нов. мед. технол. 2011. Т. 18. № 3. С. 244–248.
- Хвостова С.А.* Психофизиология стрессовых состояний при травмах опорно-двигательной системы. М.: Академия Естествознания, 2012. 179 с.
- Чердниченко Н.Л., Чердниченко Л.П.* Баланс вегетативной нервной системы и кардиореспираторных показателей у детей с различной клинической рефракцией в процессе их роста и влияние его на становление рефракции // Рос. педиатр. офтальмол. 2015. № 1. С. 33–36.
- Этенко А.И., Будаев А.В., Евтушенко А.Я.* Косвенные критерии выраженности церебральной гиперперфузии в раннем постреанимационном периоде // Медицина в Кузбассе. 2013. Т. 12. № 3. С. 48–55.
- Benetos A., Rudnichi A., Safar M., Guize L.* Pulse pressure and cardiovascular mortality in normotensive and hypertensive subjects // Hypertension. 1998. V. 32. № 3. С. 560–564.
- Dorobantu M., Simionescu M., Popa-Fotea N.M.* Molecular research in cardiovascular disease // Int. J. Mol. Sci. 2021. № 13. P. 7199. <https://doi.org/10.3390/ijms22137199>
- Gorgels A.P.M.* Практический подход к недостаточности насосной функции // Рус. мед. журн. 1997. № 6. С. 357–363.
- Hafiane A., Daskalopoulou S.* Extracellular vesicles characteristics and emerging roles in atherosclerotic cardiovascular disease // Metabolism. 2018. V. 85. P. 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.04.008>
- Jiang X., Srinivasan S.R., Urbina E., Berenson G.S.* Hyperdynamic circulation and cardiovascular risk in children and adolescents. The Bogalusa heart study // Circulation. 1995. V. 91. № 4. С. 1101–1106.
- Rezaie J., Rahbarghazi R., Pezeshki M. et al.* Cardioprotective role of extracellular vesicles: a highlight on exosome beneficial effects in cardiovascular diseases // J. Cell. Physiol. 2019. V. 234. № 12. P. 21732–21745.
- Zharska N., Budzyn V., Matviyas O. et al.* Analysis of the response and recovery levels of cardiovascular and vegetative nervous systems in people with coronary heart disease // J. Phys. Educ. Sport. 2021. V. 21. № 2. P. 765–771.

Rapid Assessment of Cardiovascular System Parameters Using Cardiorespiratory Indices

Ek. N. Mokasheva^{a,*}, Ev. N. Mokasheva^a, I. V. Grebennikova^a, V. A. Zemskova^a, and V. I. Bolotskikh^a

^a*Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia*

**e-mail: mockasheva.vrn@yandex.ru*

Cardiovascular pathology is the leading among all nosologies in terms of prevalence and mortality, prevailing in old age. It is necessary to quickly assess the work of the cardiovascular system in the practice of a clinician, especially at the outpatient stage. There are a number of indices and coefficients that can be calculated on the basis of a general examination (without financial costs), namely: Kerdo, Robinson, pulse pressure, endurance coefficient, adaptive potential according to Baevsky, the actual index of blood supply, type of self-regulation of blood circulation, stroke volume of the heart, the coefficient of blood circulation efficiency, physical condition level and the Hildebrandt index. The article provides formulas, their interpretation and possible interpretation of the results of cardiorespiratory indices.

Keywords: Kerdo index, Robinson index, pulse pressure, Baevsky index, endurance coefficient, Hildebrandt index

УДК 598.842.3

ЭТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ ЧЕЛОВЕКА И КАРЛИКОВЫХ СВИНЕЙ-КОМПАЬОНОВ

© 2023 г. Н. А. Быстрова*

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

**e-mail: natasha.b.phd@gmail.com*

Поступила в редакцию 27.09.2022 г.

После доработки 14.12.2022 г.

Принята к публикации 14.12.2022 г.

Содержание свиней в качестве лабораторных животных и животных-компаньонов стало возможным лишь в последние 70–80 лет (Bollen et al., 2010). В связи с этим актуальными стали проблемы эффективного управления их поведением и контроля за благополучием. Для успешного решения этих задач необходимо наличие структурированных и всесторонних данных об особенностях коммуникации свиней, их социального поведения и восприятия ими информации из внешней среды. В данной статье собрана и анализируется информация из немногочисленных в настоящее время актуальных публикаций об исследованиях, характеризующих работу органов чувств, специфику социального поведения и межвидовой коммуникации диких кабанов, домашних свиней продуктивных пород и карликовых домашних свиней.

Ключевые слова: карликовые свиньи, функционирование органов чувств, социальное поведение, коммуникация с человеком, обучение свиней

DOI: 10.31857/S0042132423020047, **EDN:** KMBEZJ

ВВЕДЕНИЕ

Свиньи одомашнены 9 тыс. лет назад (Гладырь и др., 2009), и до недавнего времени искусственный отбор придерживался единственно заданного направления: отбирались животные, способные жить в скученных, обедненных условиях, не боящиеся человека, набирающие как можно большую массу и дающие как можно больше потомства (Комлацкий, Величко, 2019). Детали и многие характеристики поведения не имели большого значения, индивидуальные особенности конкретного животного обычно не принимались в расчет. Однако в середине прошлого века сформировалось новое направление отбора, связанное с использованием свиней в качестве лабораторных животных. Быстрый набор веса из эволюционного преимущества трансформируется в недостаток, так как содержать 200–300-килограммовых животных в лабораториях крайне неудобно. Появилась потребность в карликовых породах свиней (в первую очередь породы юкатан и геттингенская). Масса взрослых представителей этих пород не превышает 40–45 кг (Yang et al., 2021).

Параллельно использованию в лабораториях свиньи приобретают популярность в качестве животных-компаньонов. Этому способствовал, с одной стороны, небольшой размер, благодаря которому, свинью стало возможно содержать как жи-

вотное-компаньона. С другой стороны, свиньи обладают рядом особенностей, выгодно отличающих их от других животных-компаньонов: они не пахнут (исключение составляют только интактные кабаны, однако для содержания в качестве компаньонов поросят мужского пола, как правило, кастрируют в возрасте 4–6 нед.), гораздо быстрее, чем собаки, приучаются к чистоплотности в доме, легко подстраиваются под режим дня современного человека, так как он вполне отвечает их врожденным склонностям к преимущественно утренней и вечерней активности (это те периоды дня, когда человек традиционно проводит время с домашним питомцем: до и после работы), к длительному отдыху в ночные часы (Комлацкий, Величко, 2010; личные наблюдения).

Карликовых свиней сегодня содержат в городских квартирах и воспринимают как членов семьи, наравне с кошками и собаками. Но, в отличие от владельцев собак и кошек, владельцы свиней не имеют возможности получить квалифицированную помощь дрессировщиков, специалистов по поведению, поскольку дрессировка и коррекция поведения свиней до недавнего времени была не востребована. Научные исследования в большей степени ведутся на сельскохозяйственных породах свиней и ориентированы на нужды пищевой промышленности (Duffera et al., 1999; Caballero-

Hernández et al., 2004; Wang et al., 2016; Imeah et al., 2020; Alves et al., 2022; Black et al., 2022; Ha et al., 2022), в то время как разработки эффективных методик дрессировки и протоколов коррекции поведения для конкретных видов и пород животных, в том числе карликовых свиней, немногочисленны (Tynes, 2021) и возможны только при тщательном изучении их специфики. В настоящее время у нас есть сведения о поведении нескольких пород домашних свиней (*Sus scrofa domestica*) в условиях агропромышленных комплексов и диких кабанов (*Sus scrofa*) в условиях вольер и природы, и эти данные мы можем использовать для анализа и понимания поведения карликовых свиней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящей статье проведен обзор и анализ исследований, опубликованных в период 1924–2022 гг., позволяющих расширить и обобщить понимание специфики функционирования органов чувств и поведения свиней рода *Sus* и использовать его для успешного обучения и управления поведением животных, содержащихся в лабораториях и в качестве животных-компаньонов.

Наш анализ показал, что в 77% работ использованы сельскохозяйственные породы свиней – большая белая, ландрас, дюрок, йоркшир, пьетрен, в 2% – домашние свиньи свободного содержания породы кун-кун, в 12.5% – карликовые свиньи геттингенской породы, в 8.3% – дикие кабаны.

Поиск и отбор литературы проводился в Science Direct, Google Scholar, eLibrary с использованием ключевых слов “pig”, “wild boar”, “swine”, “pig–human communication”, “pig stress signals”, “pig stress sign”, “pig facial expression”, “pig handling”, “pig learning”, “pig training”, “pig vocalization”, “pig eye contact”, “pig cognition”, “свиньи”, “кабан”, “поведение кабана”, “содержание свиней”, “экология кабана”. Ограничений по году издания не делалось. Было найдено 83 монографии и публикации. Дальнейшие ссылки были найдены в этих публикациях. Последняя публикация датирована маем 2022 г. Кроме того, использованы некоторые публикации, не вошедшие в данные базы, характеризующие поведение домашних и диких свиней.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Органы чувств и особенности восприятия информации

Для обучения свиней, как и других домашних животных, используются сигналы, которые животное способно видеть или слышать, например, цветные мишени, жесты или голосовые команды. Считается, что у свиней есть ретинальная основа для дихроматического цветового зрения. По результатам электроретинографического анализа выявля-

но (Neitz, Jacobs, 1989), что глаз свиньи содержит колбочки только одного типа, воспринимающие средневолновые (зелено-желтый) и длинноволновые (желто-красный) части спектра. Похожие выводы можно найти в более ранних исследованиях: опыты на карликовых свиньях породы питман-мур показали спектральную чувствительность глаза свиньи в области от 420 до 760 нм и способность к дифференциации голубого, зеленого, желтого и красного цветов при разной степени яркости (Мотузко, Никитин, 2003; Klopfer, Butler, 1964), что в целом соответствует цветовосприимчивости человека.

Спустя ровно 30 лет после публикации этих результатов поставлен эксперимент, сравнивающий зрение правого и левого глаза свиньи (Gourssot et al., 2019). В исследовании использованы сельскохозяйственные свиньи породы немецкий ландрас. Поросята, смотрящие правым глазом (с заклеенным левым глазом) и имеющие положительную ассоциацию с предметом, быстрее начинали вокализовать, увидев предмет, и быстрее приближались к нему. Поросята с негативным отношением к предмету не показали статистически достоверной разницы между зрением правого и левого глаза. Сформулирован вывод, что по отношению к объектам, к которым у животного сформирована положительная ассоциация, зрение правым глазом провоцирует больше исследовательских реакций, по сравнению с левым глазом. А также выдвинута гипотеза о том, что левое полушарие свиньи может с большей вероятностью отвечать за формирование и выражение положительных эмоций, а правое – отрицательных.

Глаза домашней свиньи хорошо адаптированы к поиску пищи на земле (рис. 1), обычно свинья смотрит вдоль рыла и вниз, что обеспечивается в том числе бинокулярным зрением в этой области (35°–50°). Монокулярное зрение (140°–150° с каждой стороны) обеспечивает хороший боковой обзор (Комлацкий и др., 2017; Adamczyk et al., 2015), то есть возможность обнаруживать потенциальную опасность, пищу, других свиней и т.д., что необходимо учитывать при конструировании загонов и организации условий для обучения, так как посторонние объекты и другие визуальные стимулы (тени, щели, блики), находящиеся в зоне монокулярного зрения могут легко спровоцировать пассивно-оборонительные реакции у свиньи. Следует также принимать во внимание слепую зону, составляющую около 30° и находящуюся за хвостом животного (Комлацкий и др., 2017).

Важная для животного-компаньона способность – распознавание индивидуумов другого вида. Показано, что домашние свиньи довольно быстро учатся отличать одного человека от другого, даже в возрасте 8 нед., при этом зрительные и акустические стимулы оказывают значительно большее

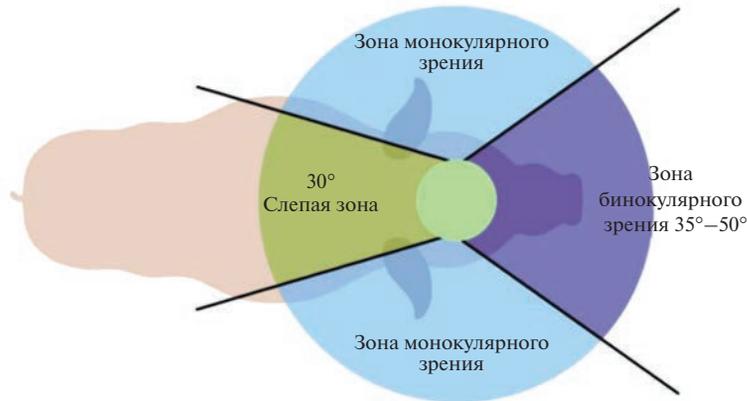


Рис. 1. Зоны монокулярного и бинокулярного зрения свиньи.

воздействие на успешное распознавание человека, чем ольфакторные стимулы (Tanida, Nagano, 1998). При более детальном изучении визуальных факторов распознавания человека выяснилось, что в первую очередь свиньи ориентировались на цвет одежды человека (Koba, Tanida, 1999) и при смене цвета переставали распознавать знакомого экспериментатора. Ориентация на цвета одежды показана ранее для дикого кабана (Майнхардт, 1983; Меунхардт, 1981, 1990) и для продуктивных домашних животных, в том числе коров (Munksgaard et al., 1997, 1999; Rybarczyk et al., 2003).

Распознавание лиц людей в отрыве от других параметров дифференцировки представляется более сложной задачей для животного. Карликовые свиньи геттингенской породы уже в возрасте 4–6 мес. умеют распознавать людей по чертам лица (Koba et al., 2012), и для этого им требуется от 4 до 12 тренировочных сессий. Однако способность генерализовать и сопоставить 2D-изображение человека на цветной фотографии в натуральную величину с живым человеком не подтвердилась в ходе эксперимента. В то же время было показано, что свиньи обучаются распознавать двух разных людей на фотографиях с той же скоростью, с которой научаются распознавать изображение двух разных абстрактных геометрических фигур (Koba et al., 2012).

Способность к генерализации была доказана для дифференциации лицевой и затылочной части головы человека у домашних свиней породы кун-кун, содержащихся на свободном выгуле. Наиболее вероятные критерии, используемые для дифференциации, — гомогенный текстурный паттерн затылочной (волосистой) части и гетерогенный паттерн лицевой части. Индивидуальные отличия проявляются в области выбора конкретных стимулов на лице человека, используемых для дифференциации: одни свиньи больше ориентируются на наличие и месторасположение подбородка и волосистой части головы, другие — на глаза, нос и рот (Wondrak et al., 2018).

Процессы генерализации и дифференциации стимулов, связанных с человеком, зависят не только от опыта предыдущих взаимодействий, но и от контекста (например, приближение человека или неподвижный человек). Неподвижный человек реже, чем приближающийся человек, вызывает реакцию страха вне зависимости от индивидуального распознавания. У поросенка может развиваться мотивация подойти к неподвижному человеку, с которым связан негативный прошлый опыт, или к незнакомому человеку после положительного опыта общения с другим человеком (Brajon et al., 2015). Подобные результаты были показаны для фермерских свиней, метисов пород дюрков, йоркшир и ландрас. Кроме того, поросята скорее приближаются к человеку, присевшему на корточках (то есть уменьшенному в размерах) и остающемуся неподвижным (хотя в исследовании (Hemsworth et al., 1986) неподвижность имела меньшее значение, чем воспринимаемый размер человека), но опасаются приближаться к человеку, стоящему в полный рост,двигающемуся в сторону животного, пытающемуся установить физический контакт с животным, а также к человеку в перчатках (Hemsworth et al., 1986).

В контексте дрессировки и формирования поведения животных зрительный контакт — первичная и неотъемлемая часть тренировочного процесса. Так, собак обучают поддерживать зрительный контакт со своим проводником в качестве базового навыка для формирования более сложных поведенческих цепочек (Miklósi et al., 2003). В свою очередь анатомия мышечного корсета свиньи в области головы и шеи влияет на особенности восприятия свиньей поз и жестов человека. Движение головы в направлении снизу вверх у сельскохозяйственных и диких свиней существенно ограничено (Swindle, Smith, 1998). Показано, что фермерские свиньи в большинстве случаев обращают внимание на ориентацию тела человека в пространстве и на жесты, им демонстрируемые, когда человек сто-

ит на коленях, и свинья способна видеть сигнал, не поднимая головы вверх (Nawroth et al., 2014). Однако наличие врожденной способности распознавать жесты человека, в отличие от способности быстро обучаться подобному распознаванию и воспринимать жест в качестве сигнала для поиска пищи, не доказано. Поросята 4–6 нед. без предварительного научения не способны понимать значение указательного жеста человека (вытянутая рука с вытянутым указательным пальцем), однако способны довольно быстро обучаться дифференцировать этот жест от других стимулов, сопутствующих человеку, и следовать в направлении указательного жеста в поисках пищи (Bensoussan et al., 2016). Это характерно и для взрослых домашних свиной, не прошедших предварительного обучения (Nawroth et al., 2016), и для диких кабанов (Albiach-Serrano et al., 2012). Более того, дикие кабаны показали лучшие результаты в тесте с указательным жестом (около 80% кабанов выбирали тот контейнер, на который человек указывал рукой), по сравнению с сельскохозяйственными свиньями пород большая белая, эдельшвайн, саттельшвайн, ангелн седлбэк, бентхайм, юрок. Способности к быстрой генерализации разных видов указательных жестов (указательный жест пальцем вытянутой руки, длинный поперечный указательный жест рукой, короткий поперечный указательный жест пальцем, перекрестный указательный жест со сгибом в локте) не обнаружены (Nawroth et al., 2016). Восприятие свиньями действий, указывающих на внимание человека к ним, исследовано мало. Существующие исследования показывают, что расположение корпуса человека (по направлению к свинье либо в противоположном направлении), даже сидящего на коленях, свиньи не дифференцируют, однако положение головы и направление взгляда являются более значимыми параметрами (Nawroth et al., 2013). Причем, чем больше времени свинья выбирает, тем выше вероятность выбора ею того человека, чье направление взгляда и поворот головы обращены к ней.

Восприятие свиньями голоса человека изучено также недостаточно. Сами свиньи используют разнообразную вокализацию в качестве элемента социального поведения внутри вида. Следовательно, можно предположить, что в процессе доместикации коммуникация между свиньей и человеком постепенно включила в себя и акустический компонент.

Известно, что слух свиньи способен распознавать звуки на частоте от 42 Гц до 40,5 кГц, что примерно соответствует частоте звучания голоса человека 80 Гц–1,4 кГц (Bensoussan et al., 2016). Чувствительность слуховых рецепторов дикого кабана очень высока. Известны факты, когда кабаны-секачи в период гона слышат человека, следующего по лесу, на расстоянии 750–800 м от них (В.А. Зайцев, персональное сообщение). Проведенные в последние годы исследования реакций

свиной на голос человека выявили, что домашние свиньи отличают голос человека от других звуков в окружающей среде и по-разному реагируют на молчащего и говорящего человека (Bensoussan et al., 2020), а также дифференцируют скорость человеческой речи. Поросята быстрее приближались к громкоговорителю с записью голоса с более быстрым ритмом, чем с замедленным; при этом проводили больше времени рядом с высокочастотным и медленным голосом, чем с низкочастотным и быстрым голосом (Bensoussan et al., 2018). В исследованиях принимали участие свиньи пород большая белая и ландрас. Голос человека хорошо выделяют и дикие кабаны в естественной среде их обитания, причем распознавание голоса человека даже на расстоянии 20–30 м далеко не всегда приводило к бегству кабанов (В.А. Зайцев, персональное сообщение).

Распознавание эмоций в речи человека ранее показано только для собак, лошадей и кошек. В отношении свиней данные остаются противоречивыми. Эксперименты (Bensoussan et al., 2018) не выявили разницы в реакциях домашних поросят на разные эмоции в голосе человека (радость, гнев) так же, как и в реакциях на громкий/резкий и тихий/мягкий звук подзыва (Hemsworth et al., 1986). Однако позже опыты (Maigrot et al., 2022) показали достоверную разницу в реакциях домашней свиньи и дикого кабана на позитивные и негативные эмоции в записи голоса человека. Домашние свиньи в ответ на проявление негативных эмоций двигались быстрее и резче, меньше времени проводили в спокойном состоянии и за поеданием пищи (Maigrot et al., 2022).

Обоняние домашних свиной в контексте коммуникации с человеком также изучено мало. Однако именно обоняние считается одним из наиболее развитых органов чувств у кабанов и домашних свиной. Дикие кабаны распознают запах человека с расстояния 300 м; они также способны к опознаванию человека и других гетероспецификов по запаху спустя год после окончания регулярных встреч с ними (Майнхардт, 1983; Meynhardt, 1981, 1990). Обоняние свиной, как и обоняние собак, на протяжении веков используется человеком для поиска целевых веществ. Обучение свиной поиску трюфелей практиковалось еще во времена Римской империи, а первое задокументированное свидетельство об этом датировано XV в. (Hall et al., 2007). 20 лет назад в США и Канаде свиной начали использовать для поиска наркотических веществ (Heining, Ruyschaert, 2016).

Признаки стресса и вокализация

Признаки стресса и дискомфорта у свиной отличаются от таковых у лошадей и собак — животных, наиболее часто используемых и изученных в качестве объектов для дрессировки. Эффективный протокол обучения животного тому или ино-

му навыку или поведению всегда включает в себя элементы мониторинга эмоционального состояния животного и своевременное реагирование на него (Starling et al., 2013). К примеру, протокол приучения свиньи к подрезанию копыт (обязательная процедура для домашних свиней-компаньонов) включает в себя элемент десенсибилизации в качестве одного из основных методов. Десенсибилизация — это способ приучения животного к определенному раздражителю, стимулу, который изначально вызывает у него страх, агрессию или другую нежелательную реакцию. В ходе десенсибилизации стимул предъявляется животному на очень низком уровне либо в очень маленьком объеме, его воздействие не доводят до порога активной реакции (сопротивление, бегство, вокализация). По мере того, как животное реагирует на стимул все меньше и меньше, интенсивность воздействия стимула постепенно увеличивают (Overall, 1997; The encyclopedia..., 2010). Чтобы иметь возможность эффективно применять десенсибилизацию, необходимо отличать признаки релаксации от признаков дискомфорта животного, так как появление признаков дискомфорта указывает на необходимость снизить уровень воздействия стимула, а появление наблюдаемых признаков устойчивого расслабления, напротив, позволяет повысить его. В результате такого обучения свиньи могут самостоятельно длительное время лежать на боку, позволяют подрезать себе копыта, не подвергаясь физическому ограничению, принуждению или наркозу.

В целом обучение в состоянии страха или стресса считается менее эффективным для любых видов животных. В частности, домашние сельскохозяйственные свиньи относятся с недоверием и страхом как к незнакомым новым предметам, так и к уже знакомым в местах своей новой локализации (Hemsworth, 1993). Карликовые свиньи геттингенской породы с трудом могут даже дифференцировать знакомого человека от незнакомого, если оказываются в новом месте (Koba, Tanida, 1999).

В литературных источниках можно найти описания признаков стресса и/или боли, выражающихся в особенностях вокализации, мимики и языка тела, двигательной активности, дыхания. Состояние стресса у свиней в большинстве исследований, как правило, наблюдается при транспортировке, иммобилизации, взаимодействии с сотрудниками ферм или лабораторий (перегоны из одного помещения в другое, выполнение ветеринарных и лабораторных процедур и манипуляций и т.д.), кастрации, купирования хвоста или отделения от группы сородичей.

Эксперименты на сельскохозяйственных свиньях показали, что вокализация, характеризующаяся высокой частотой и относительной короткой продолжительностью, возрастала с повышением уровня адреналина в плазме крови. Более

продолжительная и низкочастотная вокализация с небольшими частотными модуляциями отрицательно коррелировала с титрами кортизола (Schradler, Todt, 2010). Следовательно, можно говорить о том, что состояние острого стресса будет сопровождаться специфической высокочастотной вокализацией. По другим данным, высокочастотная вокализация сопровождается как остро негативные, так и остро позитивные эмоции у свиней, в то время как нейтральное состояние свиньи чаще коррелирует с короткой, отрывистой низкочастотной вокализацией. Продолжительная вокализация, в свою очередь, однозначно указывает на состояние страха и/или стресса, например при кастрации, иммобилизации в руках человека, насильственном удержании и прижимании к полу, изоляции от группы, невозможности добраться до соска и т.д. (Tallet et al., 2013). Диапазон вокализации свиньи может быть разбит на несколько кластеров, но наиболее распространенный в исследованиях вариант представлен двумя кластерами: высокочастотная вокализация 3000–4000 Гц и низкочастотная 100–600 Гц (Weary et al., 1998). По другой методологии, любая вокализация в диапазоне ниже 1000 Гц относится к низкочастотной, вокализация в диапазоне выше 1000 Гц — к высокочастотной (Puppe et al., 2005).

Помимо реакций на стресс, вокализация может также сопровождать реакцию на неожиданную, непредсказуемую для животного ситуацию, удивление. Этот вид вокализации напоминает лай собаки (Chan et al., 2011) и звук “хаф!” Однако у взрослой свиньи (старше 1 года) и у поросенка (4–8 нед.) лай, вероятно, различается по своему значению, поскольку лай поросенка не сопровождается реакциями бегства либо замирания в такой степени, в которой они сопутствуют лаю взрослой особи (Chan et al., 2011). Эти данные имеют большое значение не только для дрессировки, но и для коррекции поведения свиней-компаньонов, давая возможность оценить состояние животного и выбрать подходящий протокол коррекции поведения.

Мимика свиньи менее разнообразна с точки зрения человека, чем мимика других традиционных животных-компаньонов, однако причиной тому могут быть, в том числе, особенности восприятия человеком мимики свиньи. Мимика пятидневных поросят сельскохозяйственных пород исследована в процессе проведения операций по кастрации и купированию хвоста (Viscardi et al., 2017). В ходе операций тестировались мимические реакции на разные виды обезболивающих препаратов, а также на отсутствие этих препаратов. Благодаря этому установлено, что положение ушей (прижатые назад к голове), напряжение щек (кожа на рыле и щеках сжимается в складки) и форма глазных орбит (сощуренные глаза) коррелируют с ощущением боли. В то время как уши, расположенные вверх и вперед, расслабленные щеки, вытянутый нос, не напряженные веки, открытые глаза — признаки

спокойного состояния свиньи. За год до этого в ходе теста на иммобилизацию (Goumon, Špinka, 2016) среди признаков страха и стресса выделены, как и в предыдущих исследованиях, отведенные назад уши, высокочастотная вокализация, кроме того, замирание, снижение двигательной активности, реже животное ложилось.

Положение и движения хвоста могут быть еще одним показателем эмоционального состояния и домашних свиней, и дикого кабана. Расслабленное размахивание хвостом из стороны в сторону, как правило, ассоциировано с положительным эмоциональным состоянием, например во время игры или контакта с социальными партнерами (Meynhardt, 1981, 1990; Reimert et al., 2013; Marcet-Rius et al., 2018, 2019; Осеpek et al., 2020), во время контакта со знакомым человеком (Terlouw, Porcher, 2005), во время прогулки и обнюхивания земли (Newberry, Wood-Gush, 1988). Поджатый к корпусу, а иногда и спрятанный между задних ног хвост является признаком боли, страха (в том числе агрессии при страхе), холода, а также элементом позы подчинения во время социальных взаимодействий (Kiley-Worthington, 1976; Meynhardt, 1981, 1990). Однако с негативным эмоциональным состоянием иногда связано и напряженное размахивание хвостом, например в состоянии боли (Noonan et al., 1994), дистресса и фрустрации (Kiley-Worthington, 1976).

В рекомендациях по транспортировке и содержанию свиней (Benjamin, 2005) отмечаются следующие признаки стресса: тяжелое дыхание (одышка), нежелание двигаться (замирание) либо тремор конечностей. Подобные симптомы являются показателем тяжелого состояния животного, вплоть до последующего летального исхода (синдром усталости свиней, pig fatigue syndrome).

Влияние физического (тактильного) контакта на обучение

Физический контакт в обучении свиней используется в качестве как отрицательного, так и положительного подкрепления. Когда свинью удерживают или поднимают на руки, это, как правило, провоцирует состояние страха, появление признаков острого стресса, высокочастотную вокализацию, попытки вырваться и убежать (Tynes, 2021). Таким образом, подобное неприятное для животного, пугающее воздействие становится отрицательным подкреплением для того или иного поведения свиньи. С другой стороны, большинство руководств по содержанию карликовых свиней (Basic..., 2019) рекомендуют владельцам животных чесать животному область живота, боков, шеи, чтобы расслабить и успокоить его. Наблюдения автора, проведенные в питомнике карликовых свиней “Рязанская диковинка” в 2021–2022 гг., а также наблюдения В.А. Зайцева на Костромской биостанции Института проблем экологии и эволюции РАН

за дикими кабанами (В.А. Зайцев, персональное сообщение) вполне согласуются с этой рекомендацией. Действительно, тактильный контакт в области живота провоцирует абсолютное большинство карликовых свиней и дикого кабана лечь на бок в течение следующих нескольких секунд. Если воздействие продолжается, реакция на него перекрывает (overshadow) реакцию на менее значимые для животного стимулы, в других ситуациях воспринимаемые им как отрицательные (при проверке клыков, подпиливания копыта). В англоговорящем сообществе владельцев карликовых свиней существует даже специальный термин – forking, означающий чесание карликовой свиньи с помощью столовой вилки.

В целом мотивация к установлению физического контакта с человеком у продуктивных фермерских свиней в возрасте 8 нед. чрезвычайно высока и преобладает, по одним оценкам, на протяжении 35% от общего бюджета времени эксперимента (Terlouw, Porcher, 2005), по другим – 65% (Tanida et al., 1994, 1995), а также практически не уменьшается даже в том случае, если человек игнорирует попытки свиньи установить физический контакт (Terlouw, Porcher, 2005). Активность в установлении физического контакта с человеком выявили и некоторые особи диких кабанов (Meynhardt, 1981, 1990).

Тактильный контакт как один из способов положительного подкрепления поведения животного широко используется и в обучении более традиционных для дрессировки видов животных, например собак (Бочаров, Орлов, 1957) и лошадей (Баскина, 2008).

Пищевая мотивация в обучении свиней

Свиньи всеядны, им свойствен хороший аппетит и крайне высокая пищевая мотивация. Процесс поедания пищи стоит третьим по продолжительности в бюджете суточной активности после отдыха и сна: отдых (34.6%), сон (21%), поедание пищи (11.9%) (Blasetti et al., 1988). Высокая пищевая мотивация позволяет свиньям успешно обучаться даже в условиях, в которых свинья испытывает страх или средней/слабой силы стресс. Пищевая мотивация способна перекрыть мотивацию к исследовательскому, оборонительному, а иногда и социальному поведению. К примеру, при обучении свиньи находиться на специальной нестабильной площадке, подвешенной к воздушному шару, знаменитый дрессировщик В.Л. Дуров использовал следующую методику: “Ввинтил в балкон блок и устроил кожаные ремни, обшитые войлоком. Свинью я на этом подвешивал. Сначала, не чувствуя под собой почвы, она визжала, но, когда я начал давать ей любимое кушанье, она успокаивалась и, наконец, настолько освоилась со своим положением, что, наевшись в воздухе, тут же засыпала.

Привыкла она также к постепенному подъему на блоке и быстрому спуску вниз” (Дуров, 1924, с. 61–62). Свиньи отлично обучаются методом положительного подкрепления с использованием лакомства, превосходя в этом даже собак, игровая мотивация которых используется при дрессировке наравне с пищевой (Бочаров, Орлов, 1957; Зубко, 1987; Burghardt et al., 2016), и лошадей, основные методики обучения которых включают в себя работу как на отрицательном, так и на положительном подкреплении (Баскина, 2008; McCall, 1990; Warren-Smith, McGreevy, 2007).

Особенности социального поведения в контексте обучения

Дикие кабаны и домашние свиньи живут группами и испытывают стресс, когда их насильно отделяют от группы (Roy, Roy, 2019). Это свойственно большинству копытных – как диких (Баскин, 1976), так и домашних (Баскина, 2008). С точки зрения дрессировки это означает, что свинья имеет высокую мотивацию воссоединиться с группой. Особенно наглядно данная мотивация проявляется тогда, когда группа вокализирует (Roy, Roy, 2019). В период доминирования данной мотивации другие потребности (в пище, в игре, в социальном и физическом контакте с аллоспецификами) подавляются. Соответственно, снижается эффективность использования многих стимулов для обучения и поощрения.

Воссоединение со знакомой группой всегда является положительным подкреплением для свиньи. Кроме того, домашние свиньи пород большая белая, ландрас, пьетрен быстрее учатся в присутствии конспецификов (Figueoa et al., 2013). К примеру, свиньи чаще выбирают тот корм, который ела свинья из одного с ними загона или помета. Социальное взаимодействие со свиньей, у которой был недавний опыт употребления ароматизированного корма, усиливало предпочтение этого корма и могло даже пересилить неophobia в отношении нового ароматизированного корма. Действия незнакомой же свиньи влияния на выбор не оказывают.

Подражание при синхронизации действий, в том числе с запаздыванием, представляет одну из основных форм обучения и у дикого кабана. В семейных союзах кабанята подражают взрослым свиньям и друг другу в ситуации опасности, а также при сборе корма на подкормочных площадках или из кормушки (Зайцев, 1992). Кроме того, взрослые свиньи образуют между собой сбалансированные синхронные группы обычно с параллельной ориентацией тел, подражая друг другу и регулируя таким образом свое эмоциональное состояние и стратегию поведения. В ситуациях опасности и/или необходимости перемещения группы, свиньи, как и большинство других копытных животных (Баскин, 1976), в большой степени ориен-

тируются на поведение лидера группы, который не всегда имеет высокий иерархический ранг в группе, и синхронизируют свои действия с ним (Зайцев, 1992, 1999).

Видотипичные проблемы поведения домашних свиней

Учитывание этологических основ поведения домашних свиней необходимо для успешного обучения и решения проблем поведения свиней, неизбежно возникающих в момент попадания свиньи в значительно более обогащенную, по сравнению с промышленным свинокомплексом, среду обитания. К примеру, роющая активность свиней является распространенной проблемой поведения карликовых свиней, обитающих в домах и квартирах, так как сопряжена с потенциальной порчей имущества и придомовой территории. В то же время известно, что дикий кабан способен оказывать существенное влияние на динамику растительности в местах пороев, изменяя не только наземные, но даже водные экосистемы (Панкова, 2013). Крупные сельскохозяйственные свинокомплексы решают эту проблему путем максимального обеднения среды обитания свиней и исключения любой возможности для пороев. Свиньи содержатся в индивидуальных станках из оцинкованных труб шириной около 75 см и длиной около 200–210 см, которые не дают животному возможности двигаться. В качестве напольного покрытия, как правило, используется бетон, керамзитобетон, древесина или кирпич, что позволяет исключить возможность рыть субстрат (Животноводство..., 2006), однако нарушает свободу для осуществления видотипичного поведения (Mellor, 2016). Карликовым свиньям в условиях совместного жилого пространства с человеком предоставляется субстрат для осуществления роющего поведения (ковры, одеяла, мягкие лежанки и подстилки), нередко свиньи спят в кровати вместе с хозяевами, зарываясь в одеяла и постельное белье.

Другой распространенной проблемой, возникающей в случае совместного проживания свиньи с человеком, оказывается маркировочное поведение. Известно, что в дикой природе секачи и подсвинки используют несколько способов маркировки территории: насечки клыками или резцами на коре дерева, потирание/чесание о поврежденный участок окологлазничной областью, ушами, загривком, боками и другими частями тела, карпальная маркировка. Маркировочное поведение регистрируется у сеголетков, начиная с возраста 7–10 мес. (Панкова, Панков, 2020). В условиях квартиры/жилого дома выделения предглазничных, губных и карпальных желез отличаются крайне резким запахом, в связи с чем единственным решением для владельцев карликовых свиней-компаньонов является кастрация, так как кастри-

рованные кабаны не склонны проявлять маркировочное поведение. По данным питомника карликовых свиней “Рязанская диковинка” всех поросят мужского пола, подлежащих продаже в качестве компаньонов и не используемых для разведения, кастрируют в возрасте 4–6 нед.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Домашние свиньи, в том числе карликовые, имеют множество преимуществ при содержании в качестве домашних компаньонов и использовании в лабораториях в качестве объектов исследований. Чем более миниатюрными выводятся новые линии и породы, тем популярнее они становятся в этих качествах. Однако, с точки зрения управления поведением и его коррекции, свиньи заметно отличаются от более традиционных животных-компаньонов — собак, кошек и др. И отличия эти, в первую очередь, могут быть связаны именно с видотипичными особенностями свиньи — единственно копытного среди животных-компаньонов.

Данные об особенностях восприятия свиньями окружающей среды и действий человека позволяют создать более эффективные методики дрессировки и управления их поведением.

В этой связи особенно важно, что зрение свиней развито достаточно хорошо для обеспечения контакта с человеком, а цветовосприятие у свиней подобно человеческому. В коммуникации с человеком продуктивные и карликовые свиньи, как правило, используют зрительные и акустические стимулы.

В эксперименте они активно реагируют, в первую очередь, на цвет одежды человека. Свиньи способны научиться распознавать не только конкретных людей, но и человеческие лица на 2D-изображениях.

Свиньи способны распознавать звук голоса человека и реагировать на его частоту и темп речи. Постепенно появляются данные и о распознавании свиньями эмоций в голосе человека.

Обоняние у свиней чрезвычайно развито и, согласно результатам исследований, активно используется ими в ситуации опасности и для обеспечения контактов особей друг с другом (например, поросят и их матерей).

Восприятие свиньями движений, поз и жестов человека постепенно входит в сферу интересов исследователей и дрессировщиков. Показано, что свиньи с меньшим недоверием и большим интересом относятся к неподвижным, а также сидящим на коленях/на корточках людям; жесты, демонстрируемые на уровне глаз животного, в большей мере приковывают его внимание.

Большое значение для управления поведением свиней имеет установление признаков страха и стресса. В первую очередь к таковым относят про-

должительную высокочастотную вокализацию. Кроме того, отмечаются особенности мимики и языка тела — прижатые назад к голове уши, сжатая в складки кожа на рыле и щеках, сощуренные глаза, напряженно размахивающий или прижатый к животу хвост.

Физический контакт с человеком в большинстве случаев воспринимается домашними свиньями положительно и настойчиво иницируется ими даже в случае игнорирования со стороны человека. Однако не любой физический контакт с человеком может быть использован в дрессировке в качестве положительного подкрепления, так как, в частности, подъем на руки и отрывание от земли неизменно вызывает реакцию паники и острого стресса у свиньи, не приученной к данной процедуре.

В процессе обучения и коррекции поведения следует обращать внимание и на особенности социального поведения свиней, так как принадлежность к группе, отделение от группы и обучение в присутствии конспецификов имеет критически важное значение для этих животных.

На момент написания настоящего обзора степень изученности обозначенных выше особенностей поведения, когнитивных способностей и восприятия свиньями информации из окружающей среды представляется более недостаточной и определяет необходимость более детальной проработки. В том числе анализа требуют используемые в сельскохозяйственной, лабораторной и бытовой среде методики и практики дрессировки. Приведенные в статье данные могут быть использованы как основа для более эффективного управления поведением свиней и повышения уровня благополучия этих животных при фермерском, лабораторном и домашнем содержании.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность за помощь в поиске материалов и подготовке статьи к.б.н. В.А. Зайцеву, к.б.н. С.Л. Баскиной, д.б.н. Л.М. Баскину.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баскин Л.М.* Поведение копытных животных. М.: Наука, 1976. 295 с.
- Баскина С.Л.* О чем думает лошадь и как научиться ее понимать. М.: Аквариум, 2008. 224 с.

- Бочаров В.И., Орлов А.П. Дрессировка служебных собак. М.: ДОСААФ, 1957. 199 с.
- Гладырь Е.А., Эрнст Л.К., Костюнина О.В. Изучение генома свиней (*Sus scrofa*) с использованием ДНК-маркеров // Сельскохозяйств. биол. 2009. № 2. С. 16–25.
- Дуров В.Л. Дрессировка животных. Психологические наблюдения над животными, дрессированными по моему методу (40-летний опыт). М.: Универсальное изд-во, 1924. 505 с.
- Животноводство, зоогиена и ветеринарная санитария: учебник для учащихся средних специальных учебных заведений по специальности “Ветеринарная медицина” / Ред. В.А. Медведский. Витебск: ВГАВМ, 2006. 322 с.
- Зайцев В.А. Синхронизация поведения и индивидуальные дистанции в группах кабанов (*Sus scrofa* L.) // Журн. общ. биол. 1992. Т. 53. № 2. С. 243–257.
- Зайцев В.А. Вожаки, лидеры и разведчики у кабанов // Бюл. моск. общ. испыт. природы. Отд. биол. 1999. Т. 104. № 1. С. 10–17.
- Зубко В.Н. Служебное собаководство. М.: ДОСААФ, 1987. 382 с.
- Комлацкий В.И., Величко Л.Ф. Биологические основы производства свинины. Краснодар: КубГАУ, 2010. 175 с.
- Комлацкий В.И., Величко Л.Ф. Селекция свиней. Учеб. пособие. Краснодар: КубГАУ, 2019. 155 с.
- Комлацкий В.И., Величко Л.Ф., Величко В.А. Биология и этология. Учеб. пособие. Краснодар: КубГАУ, 2017. 130 с.
- Майнхардт Х. Моя жизнь среди кабанов. М.: Лесная промышленность, 1983. 129 с.
- Мотузко Н.С., Никитин Ю.И. Физиологические основы этологии сельскохозяйственных животных. Витебск: ВГАВМ, 2003. 50 с.
- Панкова Н.Л. Роль кабана (*Sus scrofa*) в динамике растительности водоемов Окского заповедника // Рос. журн. биол. инвазий. 2013. Т. 6. № 3. С. 69–87.
- Панкова Н.Л., Панков А.Б. О маркировочном поведении самцов дикого кабана *Sus scrofa* в естественных условиях // Тр. Окского гос. природ. биосфер. заповед. Вып. 39. Рязань: Рязан. обл. типография, 2020. С. 118–135.
- Adamczyk K., Górecka-Bruzda A., Nowicki J. et al. Perception of environment in farm animals – a review // Ann. Anim. Sci. 2015. V. 15. P. 565–589. <https://doi.org/10.1515/aoas-2015-0031>
- Albiach-Serran A., Bräuer J., Cacchione T. et al. The effect of domestication and ontogeny in swine cognition (*Sus scrofa scrofa* and *S. s. domestica*) // Appl. Anim. Behav. Sci. 2012. V. 141. P. 25–35.
- Alves L.K.S., Gameiro A.H., Schinckel A.P., Garbossa C.A.P. Development of a swine production cost calculation model // Animals. 2022. V. 12. P. 2229.
- Basic miniature pig care, 2019. <https://petsontheshorevvh.com/storage/app/media/Mini-Pig-Basic-Care-Client-Handout-1.pdf>
- Benjamin M.E. Pig trucking and handling – stress and fatigued pig // Adv. Pork Prod. 2005. V. 16. P. 57–66.
- Bensoussan S., Cornil M., Meunier-Salaün M.-C., Tallet C. Piglets learn to use combined human-given visual and auditory signals to find a hidden reward in an object choice task // PLoS One. 2016. V. 11. Iss. 10. P. e0164988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164988>
- Bensoussan S., Tigeot R., Lemasson A. et al. Domestic piglets (*Sus scrofa domestica*) are attentive to human voice and able to discriminate some prosodic features // Appl. Anim. Behav. Sci. 2018. V. 210. P. 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2018.10.009>
- Bensoussan S., Tigeot R., Meunier-Salaün M.-C., Tallet C. Broadcasting human voice to piglets (*Sus scrofa domestica*) modifies their behavioural reaction to human presence in the home pen and in arena tests // Appl. Anim. Behav. Sci. 2020. V. 225. P. 104965. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2020.104965>
- Black N.J., Cheng T.-Y., Arruda A.G. Characterizing the connection between swine production sites by personnel movements using a mobile application-based geofencing platform // Prevent. Veterin. Med. 2022. V. 208. P. 105753. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2022.105753>
- Blasetti A., Boitani L., Riviello M.C., Visalberghi E. Activity budgets and use of enclosed space by wild boars (*Sus scrofa*) in captivity // Zoo Biol. 1988. V. 7. P. 69–79. <https://doi.org/10.1002/zoo.1430070108>
- Bollen P.J.A., Hansen A.K., Alstrup A.K.O. The laboratory swine. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. 138 p. <https://doi.org/10.1201/9781439815304>
- Brajon S., Laforest J.-P., Bergeron R. et al. The perception of humans by piglets: recognition of familiar handlers and generalisation to unfamiliar humans // Anim. Cogn. 2015. V. 18. P. 1299–1316.
- Burghardt G.M., Albright J.D., Davis K.M. Motivation, development and object play: comparative perspectives with lessons from dogs // Behaviour. 2016. V. 153. P. 767–793.
- Caballero-Hernández A.I., Castrejón-Pineda F., Martínez-Gamba R. et al. Survival and viability of *Ascaris suum* and *Oesophagostomum dentatum* in ensiled swine faeces // Bioresour. Technol. 2004. V. 94. P. 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.12.008>
- Chan W.Y., Cloutier S., Newberry R.C. Barking pigs: differences in acoustic morphology predict juvenile responses to alarm calls // Anim. Behav. 2011. V. 82. P. 767–774.
- Duffera M., Robarge W.P., Mikkelsen R.L. Estimating the availability of nutrients from processed swine lagoon solids through incubation studies // Bioresour. Technol. 1999. V. 70. P. 261–268. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00039-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00039-5)
- Figuroa J., Solà-Oriol D., Manteca X., Pérez J.F. Social learning of feeding behaviour in pigs: effects of neophobia and familiarity with the demonstrator conspecific // Appl. Anim. Behav. Sci. 2013. V. 148. P. 120–127.
- Goumon S., Špinká M. Emotional contagion of distress in young pigs is potentiated by previous exposure to the same stressor // Anim. Cogn. 2016. V. 19. Iss. 3. P. 501–511.
- Goursot C., Düpjan S., Tuchscherer A. et al. Visual laterality in pigs: monocular viewing influences emotional reactions in pigs // Anim. Behav. 2019. V. 154. P. 183–192.
- Ha T.-H., Mahasti N.N.N., Lu M.-C., Huang Y.-H. Ammonium-nitrogen recovery as struvite from swine wastewater using various magnesium sources // Separ. Purif.

- ic. Technol. 2022. V. 308. P. 122870.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.122870>
- Hall I.R., Brown G.T., Zambonelli A. Taming the truffle: the history, lore, and science of the ultimate mushroom. Portland: Timber Press, 2007. 304 p.
- Heining P., Ruyschaert T. The use of minipig in drug discovery and development: pros and cons of minipig selection and strategies to use as a preferred nonrodent species // *Toxicol. Pathol.* 2016. V. 44. P. 467–473.
- Hemsworth P.H. Behavioural principles of pig handling // *Livestock handling and transport* / Ed. T. Grandin. Wallingford: CABI, 1993. P. 261–279.
- Hemsworth P.H., Gonyou H.W., Dziuk P.J. Human communication with pigs: the behavioural response of pigs to specific human signals // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1986. V. 15. Iss. 1. P. 45–54.
- Imeah B., Penz E., Rana M., Trask C. Economic analysis of new workplace technology including productivity and injury: the case of needle-less injection in swine // *PLoS One.* 2020. V. 15. P. e0233599.
- Kiley-Worthington M. The tail movements of ungulates, canids and felids with particular reference to their causation and function as displays // *Behaviour.* 1976. V. 56. P. 69–115.
- Klopper F.D., Butler R.L. Color vision in swine // *Am. Zool.* 1964. V. 4. P. 294.
- Koba Y., Tanida H. How do miniature pigs discriminate between people? The effect of exchanging cues between a non-handler and their familiar handler on discrimination // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1999. V. 61. Iss. 3. P. 239–252.
- Koba Y., Morita A., Rushen J. et al. Miniature pigs' abilities to discriminate people based on their photographs // *Jap. J. Anim. Psychol.* 2012. V. 62. Iss. 1. P. 1–10.
- Maigrot A.-L., Hillmann E., Briefer E.F. Cross-species discrimination of vocal expression of emotional valence by Equidae and Suidae // *BMC Biol.* 2022. V. 20. Iss. 1. P. 106.
<https://doi.org/10.1186/s12915-022-01311-5>
- Marcet-Rius M., Cozzi A., Bienboire-Frosini C. et al. Selection of putative indicators of positive emotions triggered by object and social play in mini-pigs // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2018. V. 202. P. 13–19.
- Marcet-Rius M., Fàbrega E., Cozzi A. et al. Are tail and ear movements indicators of emotions in tail-docked pigs in response to environmental enrichment? // *Animals.* 2019. V. 9. Iss. 7. P. 449.
- McCall C.A. A review of learning behavior in horses and its application in horse training // *J. Anim. Sci.* 1990. V. 68. P. 75–81.
- Mellor D.J. Updating animal welfare thinking: moving beyond the “Five freedoms” towards “A life worth living” // *Animals.* 2016. V. 6. Iss. 3. P. 21.
<https://doi.org/10.3390/ani6030021>
- Meynhardt H. Schwarzwild-Report. Vier Jahre unter Wildschweinen. Berlin: Verlag J. Neumann-Neudamm, 1981. 208 S.
- Meynhardt H. Schwarzwild-Report. Mein Leben unter Wildschweinen. Leipzig, Radebeul: Verlag J. Neumann-Neudamm, 1990. 220 S.
- Miklósi A., Kubinyi E., Topál J. et al. A simple reason for a big difference: wolves do not look back at humans, but dogs do // *Curr. Biol.* 2003. V. 13. P. 763–766.
- The encyclopedia of applied animal behaviour and welfare / Eds D. Mills, J.N. Marchant-Forde, P.D. McGreevy et al. Wallingford: CABI, 2010. 684 p.
- Munksgaard L., De Passillé A.M., Rushen J. et al. Discrimination of people by dairy cows based on handling // *J. Dairy Sci.* 1997. V. 80. P. 1106–1112.
- Munksgaard L., De Passillé A.M., Rushen J., Ladewig J. Dairy cows' use of colour cues to discriminate between people // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1999. V. 65. Iss. 1. P. 1–11.
- Nawroth C., Ebersbach M., von Borell E. Are juvenile domestic pigs (*Sus scrofa domestica*) sensitive to the attentive states of humans? The impact of impulsivity on choice behaviour // *Behav. Proc.* 2013. V. 96. P. 53–58.
<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2013.03.002>
- Nawroth C., Ebersbach M., von Borell E. Juvenile domestic pigs (*Sus scrofa domestica*) use human-given cues in an object choice task // *Anim. Cogn.* 2014. V. 17. Iss. 3. P. 701–713.
<https://doi.org/10.1007/s10071-013-0702-3>
- Nawroth C., Ebersbach M., von Borell E. Are domestic pigs (*Sus scrofa domestica*) able to use complex human-given cues to find a hidden reward? // *Anim. Welf.* 2016. V. 25. P. 185–190.
<https://doi.org/10.7120/09627286.25.2.185>
- Neitz J., Jacobs G. Spectral sensitivity of cones in an ungulate // *Vis. neurosci.* 1989. V. 2. P. 97–100.
- Newberry R.C., Wood-Gush D.G.M. The development of some behaviour patterns in piglets under semi-natural conditions // *Anim. Prod.* 1988. V. 46. P. 103–109.
- Noonan G.J., Rand J.S., Priest J. et al. Behavioural observations of piglets undergoing tail docking, teeth clipping and ear notching // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1994. V. 39. P. 203–213.
[https://doi.org/10.1016/0168-1591\(94\)90156-2](https://doi.org/10.1016/0168-1591(94)90156-2)
- Ocepek M., Newberry R.C., Andersen I.L. Which types of rooting material give weaner pigs most pleasure? // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2020. V. 231. P. 105070.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2020.105070>
- Overall K.L. Clinical behavioral medicine for small animals. St. Louis: Mosby, 1997. 544 p.
- Puppe B., Schön P.C., Tuchscherer A., Manteuffel G. Castration-induced vocalisation in domestic piglets, *Sus scrofa*: complex and specific alterations of the vocal quality // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2005. V. 95. P. 67–78.
- Reimert I., Bolhuis J.E., Kemp B., Rodenburg T.B. Indicators of positive and negative emotions and emotional contagion in pigs // *Physiol. Behav.* 2013. V. 109. P. 42–50.
- Roy R.C., Roy S. Swine communication // *Encyclopedia of animal cognition and behavior* / Eds J. Vonk, T. Shackelford. Cham: Springer, 2019. P. 6809–6813.
- Rybarczyk P., Rushen J., De Passillé A.M. Recognition of people by dairy calves using colour of clothing // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2003. V. 81. Iss. 4. P. 307–319.
- Schrader L., Todt D. Vocal quality is correlated with levels of stress hormones in domestic pigs // *Ethology.* 2010. V. 104. Iss. 10. P. 859–876.
- Starling M.J., Branson N., Cody D., McGreevy P.D. Conceptualising the impact of arousal and affective state on

- training outcomes of operant conditioning // *Animals (Basel)*. 2013. V. 3. Iss. 2. P. 300–317.
- Swindle M., Smith A.C.* Comparative anatomy and physiology of the pig // *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 1998. V. 25. P. 11–21.
- Tallet C., Linhart P., Policht R. et al.* Encoding of situations in the vocal repertoire of piglets (*Sus scrofa*): a comparison of discrete and graded classifications // *PLoS One*. 2013. V. 8. Iss. 8. P. e71841.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071841>
- Tanida H., Nagano Y.* The ability of miniature pigs to discriminate between a stranger and their familiar handler // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1998. V. 56. Iss. 2–4. P. 149–159.
- Tanida H., Miura A., Tanaka T., Yoshimoto T.* The role of handling in communication between humans and weanling pigs // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1994. V. 40. Iss. 3–4. P. 219–228.
[https://doi.org/10.1016/0168-1591\(94\)90063-9](https://doi.org/10.1016/0168-1591(94)90063-9)
- Tanida H., Miura A., Tanaka T., Yoshimoto T.* Behavioral response to humans in individually handled weanling pigs // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1995. V. 42. Iss. 4. P. 249–259.
- Terlouw E.M.C., Porcher J.* Repeated handling of pigs during rearing. I. Refusal of contact by the handler and reactivity to familiar and unfamiliar humans // *J. Anim. Sci.* 2005. V. 83. Iss. 7. P. 1653–1663.
- Tynes V.V.* Miniature pet pig behavioral medicine // *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 2021. V. 24. P. 63–86.
- Viscardi A.V., Hunniford M., Lawlis P. et al.* Development of a piglet grimace scale to evaluate piglet pain using facial expressions following castration and tail docking: a pilot study // *Front. Vet. Sci.* 2017. V. 4. P. 11.
- Wang J., Ben W.W., Yang M. et al.* Dissemination of veterinary antibiotics and corresponding resistance genes from a concentrated swine feedlot along the waste treatment paths // *Environ. Int.* 2016. V. 92–93. P. 317–323.
- Warren-Smith A., McGreevy P.* The use of blended positive and negative reinforcement in shaping the halt response of horses (*Equus caballus*) // *Anim. Welfare*. 2007. V. 16. P. 481–488.
- Weary D.M., Braithwaite L.A., Fraser D.* Vocal response to pain in piglets // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1998. V. 56. P. 161–172.
- Wondrak M., Conzelmann E., Veit A., Huber L.* Pigs (*Sus scrofa domesticus*) categorize pictures of human heads // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2018. V. 205. P. 19–27.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2018.05.009>
- Yang H.Y., Galang K.G., Gallegos A. et al.* Sling training with positive reinforcement to facilitate porcine wound studies // *JID Innov.* 2021. V. 1. P. 100016.

Ethological Basis for the Relationship between Humans and Miniature Pigs

N. A. Bystrova*

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

*e-mail: natasha.b.phd@gmail.com

Traditionally pigs are perceived as farm animals, but in the last 70–80 years they are serving some other purposes, particularly as companion animals. It is necessary to have structured and comprehensive data on the specifics of their perception, communication and social behavior to manage their behavior and welfare effectively. This article gathers and analyzes information from currently available publications and studies conducted on wild boars, domestic pigs of productive breeds and miniature pigs, characterizing the functioning of their sense organs, specifics of social behavior and communication with humans.

Keywords: pigs, miniature pigs, sense organs specifics, social behavior, human animal communication, pig training

УДК 599.323.43:575.17(5-925)

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНА ЦИТОХРОМА *b* мтДНК ПОЛЕВКИ-ЭКОНОМКИ (*Alexandromys oeconomus* Pallas, 1776) СЕВЕРО-ВОСТОЧНОЙ АЗИИ И АЛЯСКИ

© 2023 г. В. В. Переверзева¹, *, Н. Е. Докучаев¹, А. А. Примак¹, Е. А. Дубинин¹

¹Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, Магадан, Россия

*e-mail: vvpereverzeva@mail.ru

Поступила в редакцию 26.10.2022 г.

После доработки 16.11.2022 г.

Принята к публикации 17.11.2022 г.

Исследован полиморфизм нуклеотидной последовательности и гаплотипическое разнообразие гена цитохрома *b* в выборках полевки-экономки (*Alexandromys oeconomus*) с территории Северо-Восточной Азии и Аляски. Найдено 63 гаплотипа гена цитохрома *b* (51 вариант центральноазиатской генетической линии и 12 – берингийской), различающихся между собой 94 мутациями. Бассейны притоков верховьев р. Колыма заселены полевками центральноазиатской клады. В бассейне р. Омолон обнаружена смешанная популяция этого вида. На Чукотке и Аляске найдены особи только берингийской филогруппы. Генетические различия между всеми выборками статистически достоверны. Проведено сравнение генетических данных популяций *A. oeconomus* бассейна р. Колыма, Чукотки, Аляски и Северного Охотоморья. В общей сложности в нуклеотидной последовательности гена цитохрома *b* мтДНК у полевок-экономок обеих клад обнаружена 231 замена в 226 сайтах. Значения индексов молекулярного разнообразия свидетельствуют о стабильности популяций, имеющих в течение длительного времени высокое значение эффективной численности. Проведен анализ формирования генофондов популяций и предложена вероятная реконструкция сложной истории расселения этого вида по территории Северо-Восточной Азии.

Ключевые слова: полевка-экономка, *Alexandromys oeconomus*, ген цитохрома *b* (*cytb*), генетический полиморфизм, филогенетический анализ, Северо-Восточная Азия, Аляска

DOI: 10.31857/S0042132423020084, EDN: KMHVIY

ВВЕДЕНИЕ

Полевка-экономка (*Alexandromys oeconomus* Pallas, 1776) – голарктический вид, распространенный в основном на севере Евразии и Северной Америки (Воронцов и др., 1986; Shenbrot, Krasnov, 2005; Kruštufek, Shenbrot, 2022). На территории Северо-Восточной Азии он входит в число фоновых видов мышевидных грызунов. Населяет увлажненные участки в поймах рек, берега озер, болота и луговины (Юдин и др., 1976; Чернявский, 1984). Отмечен на о. Карагинский, некоторых о-вах Курильской гряды (Костенко, 2000; Костенко и др., 2004) и отдельных о-вах Тауйской губы Охотского моря (Макариков и др., 2016; Переверзева и др., 2022).

Ген цитохрома *b* мтДНК (*cytb*) кодирует одноименный фермент, лежащий в основе дыхательной цепи переноса электронов. Степень функциональной активности этого фермента определяет способность адаптации организма к различным экологическим условиям. Известно, что нуклеотидная последовательность *cytb* не только видоспецифична, но и имеет высокий уровень внутривидо-

вого полиморфизма. Изменчивость нуклеотидной последовательности *cytb* активно используется в популяционной генетике и молекулярной географии различных видов организмов, включая *A. oeconomus* (Brunhoff et al., 2003, 2006; Abramson, Tikhonova, 2005; Fink et al., 2010; Dabrowski et al., 2013; Jancewicz et al., 2015). На основании разнообразия нуклеотидной последовательности *cytb* у полевок-экономки выделены четыре генетические клады – североазиатская, центральноазиатская, берингийская и европейская (Brunhoff et al., 2003). Северо-восточная часть азиатского ареала этого вида заселена полевками центральноазиатской и берингийской филогрупп (Brunhoff et al., 2003; Galbreath, Cook, 2004; Abramson, Tikhonova, 2005; Iwasa et al., 2009; Haring et al., 2011; Lisovsky et al., 2018). Ранее показано, что верховья р. Омолон населяют полевки-экономки обеих вышеобозначенных генетических клад (Galbreath, Cook, 2004).

В настоящее время изучение структуры генофондов популяций относится к одному из приори-

тетных разделов комплексного анализа видовой изменчивости. Проведенное нами ранее исследование генетической структуры и филогенетических связей островных и материковых популяций полевки-экономки позволило реконструировать возможную историю заселения этим видом Северного Охотоморья (Переверзева и др., 2022). Предлагаемые результаты являются продолжением этой работы. Цели – проанализировать генетическую структуру и филогенетические связи популяций полевки-экономки бас. р. Колыма, Чукотки и Аляски; с учетом полученных ранее сведений об особенностях генетической структуры популяций *A. oeconomus* Северного Охотоморья провести реконструкцию возможной истории формирования генофонда вида в пределах Северо-Восточной Азии в целом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Карта-схема мест сбора материала приведена на рис. 1. Исследованы четыре выборки полевки-экономки из бас. р. Колыма, одна – с южного побережья Чаунской губы (Чаун) и одна – из Центральной Аляски (окрестности г. Фэрбенкс). Характеристики выборок из исследованных популяций полевок и обобщенные сведения о молекулярном разнообразии *A. oeconomus* Северного Охотоморья представлены в табл. 1. Выделение, очистку тотальной ДНК, амплификацию нуклеотидной последовательности *cytb*, очистку продукта полимеразной цепной реакции и секвенирование полной нуклеотидной последовательности *cytb* мтДНК проводили ранее описанными методами (Переверзева и др., 2018). Картирование *cytb*, определение филогенетических отношений гаплотипов полевок-экономок, методы статистической обработки и анализа генетических данных представлены в нашей предыдущей статье (Переверзева и др., 2022). Дендрограмма групп, схожих по нуклеотидной последовательности EcbCA-гаплотипов *cytb*, строилась по методу ближайшего связывания (NJ). Для данного построения в качестве внешней группы использовали последовательность нуклеотидов гена *cytb* *Craxomys rufocanus*, GenBank № KR059876 (Переверзева и др., 2018). Дендрограмма филогенетических отношений *cytb*-EcbCA-гаплотипов построена с применением метода максимального правдоподобия (ML). Внешней группой взята последовательность нуклеотидов EcbB3. Построение обоих деревьев проводилось с использованием пакета программ MEGA 6.0.2.74 (Tamura et al., 2013). Медианная сеть EcbB3-гаплотипов построена с применением пакета программ Network 4.5.1.0 (Bandelt et al., 1999). Для анализа из GenBank дополнительно использованы полные нуклеотидные последовательности *cytb* образцов №№ AY305184–AY305188, AY305211–AY305239 (Galbreath, Cook, 2004) и №№ AB372197–AB372200

(Iwasa et al., 2009). Как и в предыдущей публикации (Переверзева и др., 2022), гаплотипам *cytb* полевок-экономок центральноазиатской генетической линии присвоена аббревиатура EcbCA, берингийской – EcbB.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика выборок полевки-экономки из популяций бас. р. Колыма, Чукотки и Аляски и нуклеотидных замен в кодонах гена цитохрома b

Исследована полная нуклеотидная последовательность *cytb* 144 особей *A. oeconomus* из шести выборок (табл. 1). Ген *cytb* состоит из 1143 пар нуклеотидов и расположен с 14118-ой по 15260-ю позицию мтДНК. У полевок-экономок Северо-Восточной Азии и Аляски найдено 63 гаплотипа *cytb* (51 EcbCA и 12 EcbB), различающихся между собой 94 мутациями. Замены относительно полной нуклеотидной последовательности EcbCA1 и номера обнаруженных гаплотипов *cytb* в электронной базе данных GenBank показаны на рис. 2. Доля замен в нуклеотидной последовательности *cytb* полевок филогруппы EcbCA – 0.0490, EcbB – 0.0245. Общая доля вариабельных сайтов составляет 0.0761 от всей длины *cytb*. Характеристики нуклеотидных замен представлены в табл. 2.

В нуклеотидной последовательности *cytb* *A. oeconomus* обеих генетических линий транзиций найдено на порядок больше, чем трансверсий, что согласуется с литературными данными (Nei, 1987; Nei, Kumar, 2000). В кладе EcbCA отношение транзиций/трансверсий составляет 27, что в 3.5 раза превышает соответствующие значения, найденные ранее (Переверзева и др., 2022; Brunhoff et al., 2003). В генетической линии EcbB отношение транзиций/трансверсий имеет величину 8.33, в общей выборке, включающей обе линии, – 6.83. Эти значения близки к обнаруженным в предыдущих исследованиях (Переверзева и др., 2022; Brunhoff et al., 2003).

Известно, что большая вариабельность третьего нуклеотида кодона в транслируемых участках гена определяется вырожденностью генетического кода (Zardoya, Meyer, 1996), и в большинстве триплетов распределение нуклеотидных замен в первой, второй и третьей позициях соответствует 2 : 1 : 9 (Hassanin et al., 1998). Полученные нами результаты отличаются от данного соотношения. У полевки-экономки клады EcbCA в *cytb* доля транзиций в первой, второй и третьей позициях кодона составляет 5 : 1 : 12. У представителей EcbB-клады – 1 : 0 : 4. Транзиции в триплетях общей выборки – 6.7 : 1 : 19.7. Трансверсий в нуклеотидной последовательности *cytb* у полевок филогруппы EcbCA во второй позиции кодона не найдено, в первой и третьей они представлены в равных долях. У представителей клады EcbB трансверсии также обнаружены только в первой и третьей позиции кодона в соотношении 1 : 2 (табл. 2). В общей выборке исследованных поле-

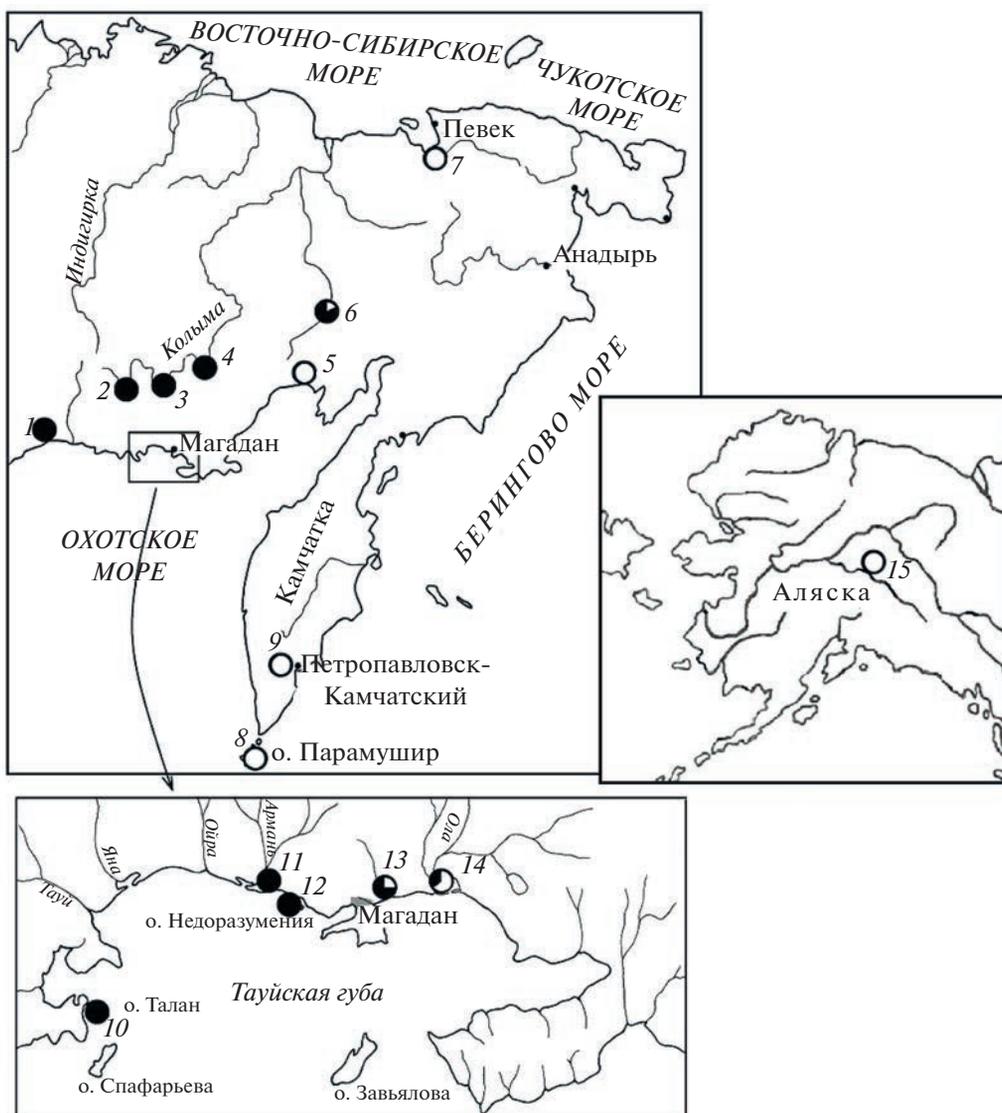


Рис. 1. Карта-схема мест сбора проб полевки-экономки центральноазиатской и берингийской филогрупп (показаны кружками с черной и белой заливкой соответственно); в случае присутствия обеих филогрупп их доля соответствует размеру выделенных секторов. Цифрами обозначены: 1 – пос. Охотск, бас. рек. 2 – Кулу, 3 – Детрин, 4 – Среднекан, 5 – пос. Эвенск, 6 – бас. р. Омолон, 7 – Чаун, 8 – о. Парамушир, 9 – п-ов Камчатка, 10 – о. Талан, 11 – пос. Армань, 12 – о. Недоразумения, 13 – г. Магадан, 14 – пос. Ола, 15 – г. Фэрбенкс (Аляска).

вок трансверсии в триплетях *cytb* в первой и третьей позициях соотносятся как 1 : 4.88. Полученные результаты свидетельствуют о том, что эти генетические линии различаются в основном трансверсиями в третьей позиции кодонов *cytb*. По-видимому, данное распределение замен является видовой особенностью *A. oesonotus*.

Характеристика гаплотипов cytb в выборках из популяций полевки-экономки бас. р. Колыма

На рис. 3 представлены доли вариантов *cytb*-гаплотипов в выборках из исследованных популяций *A. oesonotus*. Река Кулу и притоки р. Колы-

мы (Детрин, Среднекан и Омолон) расположены с юго-запада на северо-восток (рис. 1). В выборках полевок-экономок из бас. рр. Кулу, Детрин и Среднекан обнаружены представители только филогруппы *EcbSA*. Объем выборки полевок из бас. р. Среднекан втрое превышает таковой из бас. р. Кулу и более чем вчетверо из популяции этого вида бас. р. Детрин. Количество найденных гаплотипов *cytb* в каждой из групп пропорционально размеру выборок, однако число переменных сайтов (*V*), среднее число попарных различий между гаплотипами (*Pi*) и нуклеотидное разнообразие (*π*) в этих выборках имеют близкие достаточно высокие значения (табл. 1). Следует

Таблица 1. Характеристика выборок и молекулярного разнообразия популяций *A. oesolotus* Северо-Восточной Азии и Аляски

| Место сбора материала (точка на карте, рис. 1) | N | n | Доля особей гаплогрупп | | Индексы молекулярного разнообразия | | | | |
|---|-----|-----|------------------------|-----------|------------------------------------|---|-----------------|-----------------|--|
| | | | EcbCA/V | EcbBг/V | V | Pt ± sd | π ± sd | h ± sd | |
| Бас. р. Колыма | 12 | 10 | 1.00 | 0 | 14 | 3.3333 ± 1.8390 | 0.0029 ± 0.0018 | 0.9545 ± 0.0569 | |
| Детрин (3) | 8 | 4 | 1.00 | 0 | 13 | 3.7143 ± 2.0955 | 0.0033 ± 0.0021 | 0.6429 ± 0.1841 | |
| Среднекан (4) | 36 | 24 | 1.00 | 0 | 17 | 3.3794 ± 1.7721 | 0.0030 ± 0.0017 | 0.9651 ± 0.0167 | |
| Омолон (6) | 47 | 16 | 0.8511/26 | 0.1489/12 | 57 | 12.8492 ± 5.8940 | 0.0112 ± 0.0057 | 0.8834 ± 0.0257 | |
| Сумма | 103 | 54 | 0.9320/56 | 0.0680/12 | 80 | 11.0935 ± 5.0806 | 0.0097 ± 0.0049 | 0.9694 ± 0.0072 | |
| Чукотка (Чаун) (7) | 4 | 3 | 0 | 1.00 | 5 | 2.8333 ± 1.8713 | 0.0025 ± 0.0020 | 0.8333 ± 0.2224 | |
| Аляска (г. Фэрбенкс) (15) | 37 | 6 | 0 | 1.00 | 6 | 0.9910 ± 0.6850 | 0.0009 ± 0.0007 | 0.5901 ± 0.0842 | |
| Северное Охотоморье* | 202 | 58 | 0.5149/42 | 0.4851/46 | 96 | 22.056 ± 9.7591 | 0.0193 ± 0.0095 | 0.9573 ± 0.0053 | |
| Филогруппы | | | | | | | | | |
| | | | | | | Место сбора материала – бас. р. Колыма, Чукотка и Аляска | | | |
| Центральноазиатская | 96 | 51 | 1.00 | 0 | 56 | 7.7048 ± 3.6220 | 0.0067 ± 0.0035 | 0.9660 ± 0.0082 | |
| Берингийская | 48 | 12 | 0 | 1.00 | 27 | 4.7819 ± 2.3780 | 0.0042 ± 0.0023 | 0.7518 ± 0.0609 | |
| Сумма | 144 | 63 | 0.6667/56 | 0.3333/27 | 87 | 18.9646 ± 8.4485 | 0.0166 ± 0.0082 | 0.9578 ± 0.0090 | |
| | | | | | | Место сбора материала – Северное Охотоморье, бас. р. Колыма, Чукотка и Аляска | | | |
| Центральноазиатская | 200 | 87 | 1.00 | 0 | 73 | 7.6716 ± 3.5914 | 0.0067 ± 0.0035 | 0.9762 ± 0.0035 | |
| Берингийская | 146 | 39 | 0 | 1.00 | 58 | 8.6111 ± 4.0013 | 0.0075 ± 0.0039 | 0.9438 ± 0.0087 | |
| Сумма | 346 | 126 | 0.5780/73 | 0.4220/58 | 126 | 21.7641 ± 9.6175 | 0.0190 ± 0.0093 | 0.9821 ± 0.0020 | |

Примечание: * – о-ва и побережье от пос. Охотек до пос. Эвенск и о. Парамушир Курильской гряды; N – объем выборок; n – число гаплогрупп; EcbCA – центральная азиатская филогруппа; EcbBг – берингийская филогруппа; V – число переменных сайтов в гене *суб* мтДНК; Pt – среднее число попарных различий между гаплогруппами; π – нуклеотидное разнообразие; h – гаплогруппическое разнообразие; sd – стандартное отклонение.

| | 2689144511 | 4770145306 | 111122 | 222222333 | 333444444 | 455556666 | 667777778 | 888889999 | 999999900 | 111111111 | 111111111 | 111111111 |
|----------|------------|--------------|-----------------|---------------------------------|----------------------|---------------------------------------|--|---------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| EcbCA1 | MT093810 | TGAACACTTT | GCACAAAAGC | TGTAACCTTT | TAGGCAACTT | GTAGATCACC | GCCTCTGCAC | AAATCTCGAA | GGATCACATA | AAGCATC | | |
| EcbCA3 | MT127791 |G..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA20 | MT093811 |G..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA23 | MZ246547 |C..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA24 | MZ246545 |G..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA25 | MZ246546 |G..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA28 | MT134269 |C..... |G..... |G..... |G..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA29 | MT134268 |G..... |G..... |G..... |G..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA30 | MT134267 |C..... |G..... |G..... |G..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA31 | MT134266 |A..... |C..... |C..... |C..... |TT..... |TT..... |TT..... |TT..... |TT..... |TT..... |TT..... |
| EcbCA32 | MT134265 |C..... |G..... |G..... |G..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA33 | MT134264 |T..... |G..... |G..... |G..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA35 | MZ246540 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA36 | MZ246539 |A..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA37 | MZ246543 |C..... |G..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA38 | MZ246544 |G..... |G..... |G..... |G..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA39 | MZ246541 |G..... |G..... |G..... |G..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA40 | MZ246542 |G..... |G..... |G..... |G..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA41 | MZ269491 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA42 | MZ246538 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA50 | MZ246535 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA51 | MZ246526 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA52 | MZ246528 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA53 | MZ246525 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA54 | MZ246532 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA55 | MZ246536 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA56 | MZ246534 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA57 | MZ246530 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA58 | OL515840 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA59 | MZ246529 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA60 | MZ246533 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA61 | MZ246521 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA62 | MZ246522 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA63 | MZ246523 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA64 | MZ246524 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA65 | MZ246527 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA66 | MZ246531 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA67 | OL515841 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA68 | OL515842 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA69 | OL515843 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA70 | OL515844 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA71 | OL515845 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA72 | OL515846 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbCA73 | OL515847 |G..... |C..... |A..... |A..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| AY305234 | |C..... |G..... |G..... |G..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| AY305225 | |C..... |G..... |G..... |G..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| AY305238 | |C..... |G..... |G..... |G..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| AY305232 | |C..... |G..... |G..... |G..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| AY305213 | |C..... |G..... |G..... |G..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| AY305222 | |C..... |G..... |G..... |G..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| AY305215 | |C..... |G..... |G..... |G..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbBr12 | MT085481 | C.....T.TACC | CAG.....G..... |G.....C.....G..... | C.....AT.....T..... |C.....T.....A.....C..... |C.....C.....C.....GG..... | A.....GC.....T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbBr16 | MT085485 | C.....TACC | CAG.....G..... |GG.....C.....G..... | C.....AT.....T..... |CT.....T.....A.....C..... |C.....C.....C.....GG..... | A.....T.....GC.....T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbBr18 | MT127793 | CA.....TACC | CAG.....GG..... |G.....C.....G.....C..... | AT.....T.....C..... |CTG.....T.....A.....C.....A..... |C.....C.....C.....G.....A.....T.....C..... |T.....CT..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbBr19 | MT127794 | C.....TACC | CAG.....GG..... |G.....CC.....G.....C..... | AT.....T.....C..... |CTG.....T.....A.....C.....A..... |C.....C.....C.....G.....A.....T.....GC..... |T.....T.....CT..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbBr20 | MT081254 | C.....G.ACC | CAG.....G..... |G.....TC.....G.....C..... | AT.....T..... |C.....G.....T.....A.....C..... |C.....C.....C.....G.....A.....GC..... |T.....T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbBr21 | MT081255 | C.....GTACC | CAG.....G..... |CG.....TC.....G.....C..... | AT.....T..... |C.....G.....T.....A.....C..... |C.....C.....C.....G.....A.....GC..... |T.....T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbBr22 | MT081256 | C.....GTACC | CAG.....G..... |G.....TC.....G.....C..... | AT.....T..... |C.....G.....T.....A.....C..... |C.....C.....C.....G.....AG.....GC..... |T.....T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbBr23 | MT081257 | C.....G.ACC | CAG.....G..... |G.....TC.....G.....C..... | AT.....T..... |C.....G.....T.....A.....C..... |C.....C.....C.....G.....A.....GC..... |T.....T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbBr24 | MT081258 | C.....GTACC | CAG.....G..... |G.....TC.....G.....C..... | AT.....T..... |C.....G.....T.....A.....C..... |C.....C.....C.....G.....A.....GC..... |T.....T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| EcbBr26 | MT127795 | C.....TACC | CAG.....GG..... |G.....C.....G.....C..... | AT.....GT.....C..... |CTG.....T.....A.....C.....A..... |C.....C.....C.....G.....A.....T.....GC..... |T.....T.....CT..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| AY305127 | | C.....GTACC | CAG.....G..... |G.....TC.....G.....C..... | AT.....T..... |C.....G.....T.....A.....C..... |C.....C.....C.....G.....A.....T.....GC..... |T.....T..... |T..... |T..... |T..... |T..... |
| AY305186 | | C.....TACC | CAG.....G..... |GG.....C.....G.....C..... | AT.....T..... |G.....CT.....T.....A.....C..... |C.....C.....C.....G.....T.....GC..... |T.....T.....CT..... |T..... |T..... |T..... |T..... |

Рис. 2. Гаплотипы гена цитохрома *b* полевки-экономки из популяций Северо-Восточной Азии и Аляски. Нуклеотидные замены представлены относительно последовательности варианта EcbCA1. Замены показаны от начала гена цитохрома *b*.

отметить, что в выборках полевков из популяций бас. рр. Кулу и Детрин превалирует один из EcbCA-гаплотипов – EcbCA1 и EcbCA35 соответственно. Остальные варианты нуклеотидной последовательности *cytb* найдены в небольших долях, равных для каждой из выборок (рис. 3). Распределение обнаруженных *cytb*-гаплотипов в выборке полевков из бас. р. Среднекан сложнее. Наиболее представлен вариант EcbCA67, доля EcbCA51 несколько меньше, третий по распространению – EcbCA52. Варианты EcbCA50, EcbCA53 и EcbCA72 обнаружены в равных, четвертых по уровню встречаемости, долях. Остальные гаплотипы найдены у единичных экземпляров (рис. 3). Полученные результаты косвенно свидетельствуют о высоком уровне полиморфиз-

ма *cytb* в генофондах данных популяций *A. oeconomus*. Параметры π и P_i для выборок полевков-экономок из бас. рр. Кулу, Детрин и Среднекан имеют близкие значения. Гаплотипическое разнообразие (h) в выборке полевков из бас. р. Детрин несколько ниже, чем в исследованных группах этого вида из бас. рр. Кулу и Среднекан, что может быть связано с меньшей численностью особей, отловленных в бас. р. Детрин (табл. 1).

Река Омолон – самый восточный приток р. Колыма, в бассейне которого проводился отлов полевков-экономок для нашей работы. В выборке полевков из этой популяции в предыдущем (Galbreath, Cook, 2004) и в нашем исследовании найдены особи генетических линий EcbCA и EcbBr.

Таблица 2. Локализация нуклеотидных замен в кодонах *cytb* у полевки-экономки бас. р. Колыма, Чукотки и Аляски

| Филогруппы | Доля замен | | | | | |
|---------------------|-------------------------|--------|--------|-------------------------|------|--------|
| | транзиция | | | трансверсия | | |
| | позиция замены в кодоне | | | позиция замены в кодоне | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| Центральноазиатская | 0.2679 | 0.0536 | 0.6429 | 0.0179 | 0.00 | 0.0179 |
| Берингийская | 0.1785 | 0.00 | 0.7143 | 0.0357 | 0.00 | 0.0714 |
| Суммарно | 0.2128 | 0.0319 | 0.6277 | 0.0213 | 0.00 | 0.1064 |

Следует отметить, что доля полевки кланды *EcbCA* (0.8511; табл. 1) составляет основную часть выборки. Наиболее распространены гаплотипы *EcbCA29* и *EcbCA33* (0.2128), несколько реже встречается *EcbCA28* (0.1702). Остальные *EcbCA* в этой выборке полевки определены у единичных экземпляров (рис. 3). Нуклеотидных последовательностей *EcbBr12* и *EcbBr16* найдено втрое больше, чем *AY305186*, который был обнаружен ранее (Galbreath, Cook, 2004), но не выявлен в нашем исследовании. Всего типировано 13 гаплотипов кланды *EcbCA* и три – *EcbBr*, что определило уровни *Pi* и π , которые на порядок превышают та-

ковые в выборках этого вида из пойм рр. Кулу, Детрин и Среднекан (табл. 1). Наличие в популяции *A. oecopotus* бас. р. Омолон *EcbBr*-гаплотипов значительно повышает индексы молекулярного разнообразия в общей выборке этого вида из бас. р. Колыма (табл. 1).

Филогенетические отношения EcbCA-гаплотипов cytb в выборках из популяций полевки-экономки бас. р. Колыма

Для характеристики филогенетических отношений *cytb*-*EcbCA*-гаплотипов *A. oecopotus*, на-

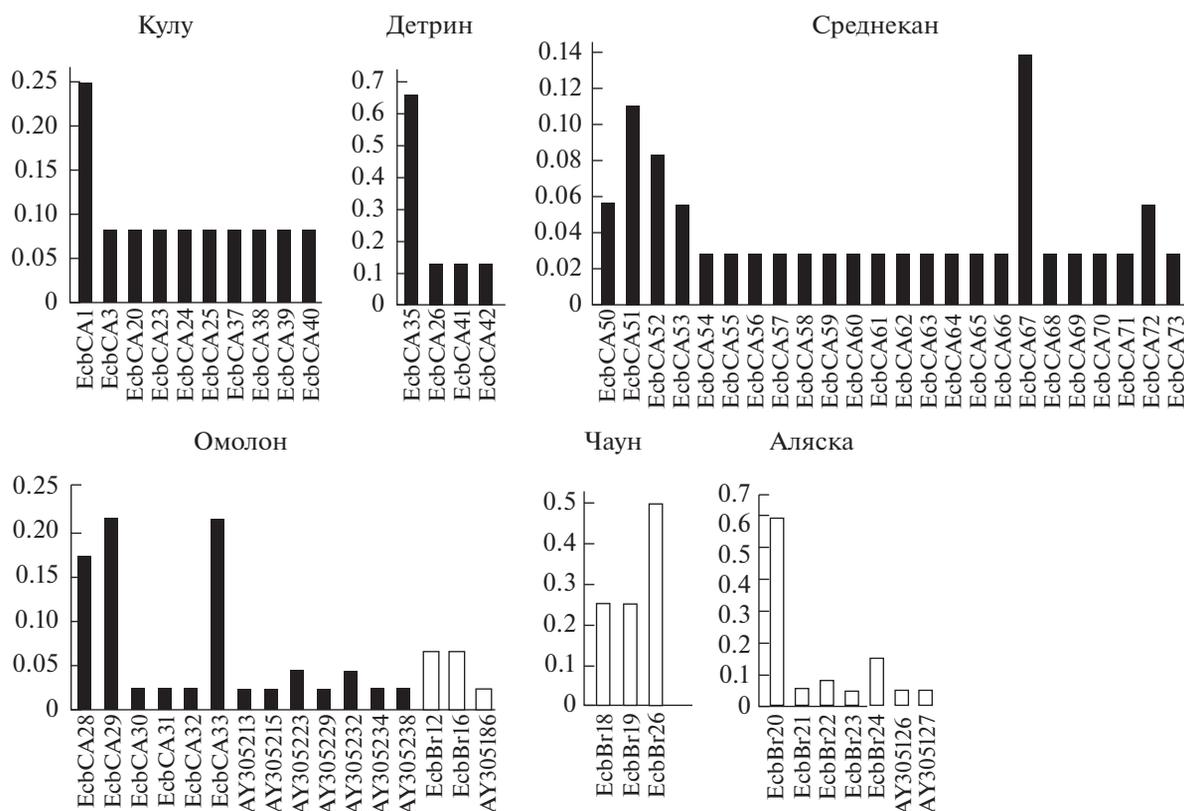


Рис. 3. Доли гаплотипов гена цитохрома *b* в выборках полевки-экономки из популяций Северо-Восточной Азии и Аляски (гаплотипы центральноазиатской и берингийской филогрупп показаны столбцами с черной и белой заливкой соответственно).

селяющих бас. р. Колыма, построена ML-дендрограмма (рис. 4). На представленном дереве имеют место три ответвления (А, Б, В). Клада А объединяет гаплотипы всех особей, отловленных в бас. р. Среднекан; EcbCA36 – найден у полевок-экономки, пойманной в бас. р. Детрин; варианты EcbCA29, EcbCA31, AY305213 и AY305232 идентифицированы у экземпляров, добытых в бас. р. Омолон. Клада Б включает только варианты *cytb* полевок из бас. р. Кулу. Кладу С составляют гаплотипы особей, населяющих бас. рр. Омолон, Детрин и Кулу.

Нуклеотидные последовательности *cytb*-EcbCA-гаплотипов полевок-экономок бас. р. Кулу – EcbCA1, EcbCA3, EcbCA20, EcbCA38 – входят в кладу В, остальные варианты *cytb* образуют кладу Б. Их нуклеотидные последовательности отличаются от наиболее распространенного в этой выборке варианта EcbCA1 (рис. 3), от одной (EcbCA37) до трех (EcbCA3, EcbCA20, EcbCA23, EcbCA24, EcbCA39) замен (рис. 2). Транзиция в первой позиции кодона A1090G обуславливает наличие субклады гаплотипов EcbCA24, EcbCA39, EcbCA40 с бутстреп-поддержкой 78%. Аналогичная замена G1108A приводит к появлению субкластера EcbCA23, EcbCA25 также с бутстреп-индексом 78%. Нуклеотидные последовательности остальных *cytb*-EcbCA-гаплотипов полевок данной выборки клады В значимых различий не имеют. Следует отметить, что из 14 замен в нуклеотидной последовательности гена *cytb* полевок-экономок бас. р. Кулу 9 являются уникальными для особей этого вида колымского бассейна. Кроме того, ни один гаплотип полевок из бас. р. Кулу не имеет явного сходства с EcbCA-вариантами особей из остальных выборок полевок-экономок бас. р. Колыма.

У полевок-экономок, отловленных в бас. р. Детрин, найдены *cytb*-EcbCA-гаплотипы двух типов – схожие по нуклеотидной последовательности гаплотипы EcbCA35, EcbCA41, EcbCA42, образующие на дендрограмме субкладу с бутстреп-поддержкой 94% в кладе В и EcbCA36, входящий в кладу А и различающийся с гаплотипом EcbCA65, который был обнаружен у особи из бас. р. Среднекан, транзицией в первой позиции кодона G304A. Варианты EcbCA35, EcbCA41, EcbCA42 разнятся с нуклеотидной последовательностью EcbCA1 транзициями в третьей позиции кодона A303G, T318C, G585A, T990C и трансверсией также в третьей позиции кодона A1098C (рис. 2). Нуклеотидная последовательность EcbCA41 отличается от наиболее представленного у полевок данной выборки EcbCA35 (рис. 3) одной нуклеотидной заменой, от EcbCA42 – тремя (рис. 2). Гаплотип EcbCA36 не содержит ни одной общей замены с вариантами субклады EcbCA35, EcbCA41, EcbCA42 (рис. 2). Полученные результаты свидетельствуют о формировании генофонда популяции *A. oeconomus* бас. р. Детрин из двух конспецифичных источников.

По-видимому, большая часть полевок-экономок, обитающих в бас. р. Детрин, являются потомками особей, генофонд которых был сформирован в одном рефугиуме. Предки носителей гаплотипа EcbCA36 обитали в другом рефугиуме, который, возможно, существовал в районе бас. р. Среднекан. Следует отметить, что гаплотипы полевок-экономок, отловленных в бас. р. Среднекан, не образуют субклад с высоко значимыми бутстреп-индексами, что может свидетельствовать об их монофилетическом происхождении.

Анализ нуклеотидной последовательности *cytb*-EcbCA особей *A. oeconomus*, добытых в бас. р. Омолон, дает основание предположить формирование EcbCA клады этой популяции также из двух конспецифичных источников. Гаплотипы EcbCA29, EcbCA31, AY305213 и AY305232, входящие в кладу А, имеют нуклеотидные последовательности, сходные с вариантами *cytb* полевок бас. р. Среднекан (рис. 2, 4). Относительно последовательности нуклеотидов EcbCA1 все гаплотипы полевок-экономок бас. р. Среднекан и варианты EcbCA29, EcbCA31, AY305213, AY305232, обнаруженные у полевок бас. р. Омолон, включают транзиции в первой позиции кодона T841C, G1000A и транзицию в третьем нуклеотиде кодона C1122T, что, вероятно, указывает на общность их происхождения. Все полученные результаты позволяют предположить наличие в ледниковый период достаточно крупного рефугиума в районе бас. р. Среднекан, из которого впоследствии экономки проникли в бас. рр. Детрин и Омолон. Остальные *cytb*-EcbCA-гаплотипы полевок из бас. р. Омолон входят в кладу В, в которой образуют сложную субкладу с бутстреп-индексом 52%, включающую в себя три субклады с разной степенью бутстреп-поддержки (рис. 4). Нуклеотидная последовательность данных гаплотипов также включает замену C1122T, возможно, произошедшую в геноме *A. oeconomus* до последнего оледенения. Впоследствии носители этой мутации оказались в двух различных рефугиумах, что привело в результате синергии эффекта основателя, отбора и микроэволюционных процессов в изолированных популяциях к формированию генофондов различных профилей, но включающих одну одинаковую замену. Все *cytb* данной группы гаплотипов содержат транзиции в первой A568G и третьей C804T позиции кодона. Кроме того, варианты EcbCA30 и AY305238, образующие субкладу с бутстреп-индексом 83%, имеют транзиции в третьей позиции кодона T471C и C801T (рис. 2).

Филогенетические отношения EcbCA-гаплотипов cytb в выборках из популяций полевки-экономки Северного Охотоморья, бас. р. Колыма и Северо-Восточной Азии в целом

У полевок-экономок, отловленных в бас. р. Кулу и у пос. Армань (Северное Охотоморье), найдены

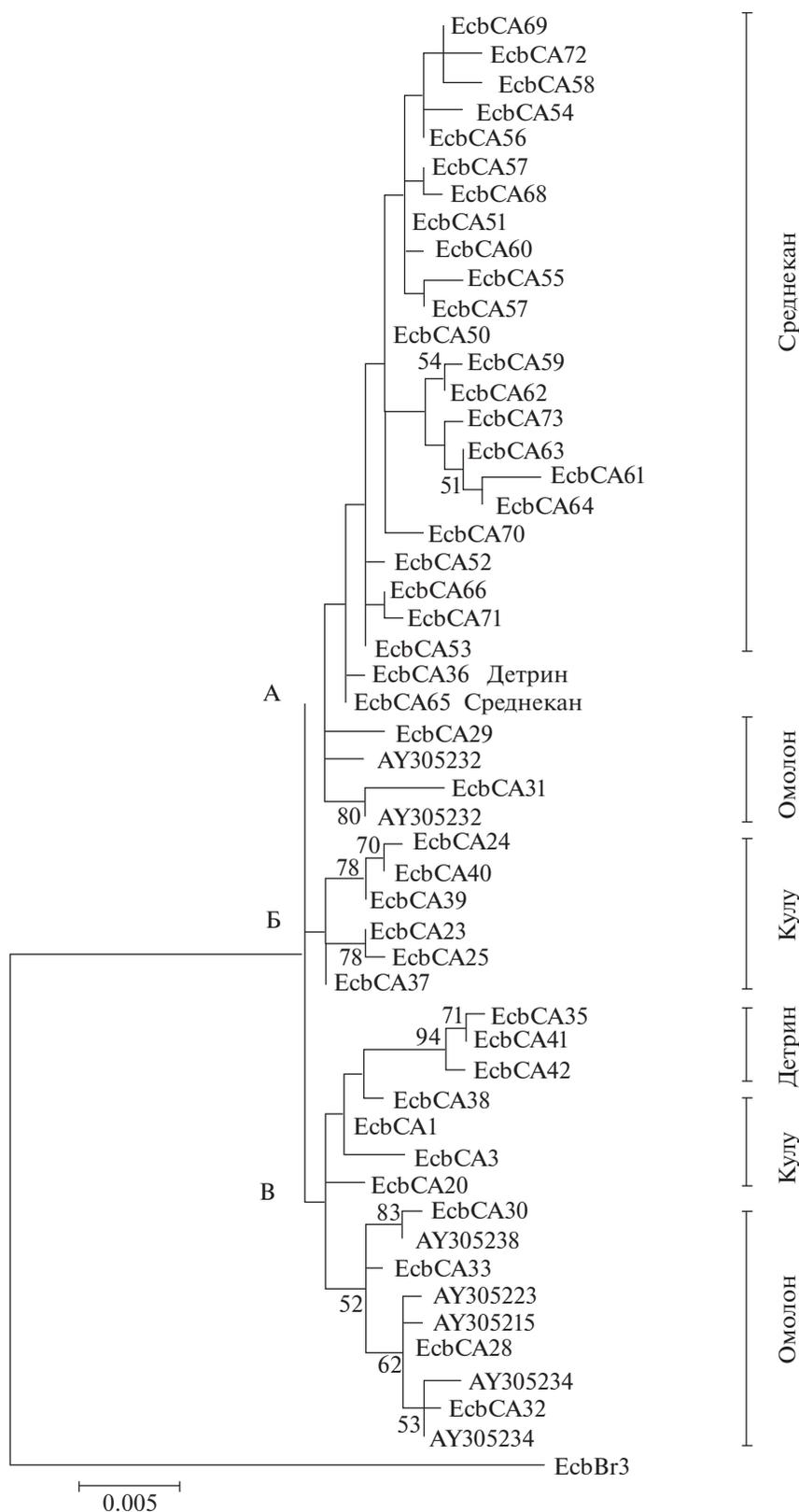


Рис. 4. ML-филогенетическое дерево, построенное по данным об изменчивости нуклеотидной последовательности гена цитохрома *b* мтДНК полевки-экономки центральноазиатской клады из популяций бас. р. Колыма. В узлах ветвления указаны бутстреп-индексы (> 50%).

Таблица 3. Замены в нуклеотидной последовательности *cytb* в гаплотипах полевки-экономки из Северного Охотоморья и бас. р. Колыма

| Гаплотип | Локальность | Нуклеотидная замена |
|---------------------------|------------------------------------|------------------------|
| EcbCA2 | Магадан | G219A; T592C*; T975C |
| EcbCA48 | Атарган | |
| EcbCA3 | Магадан, Армань, Кулу ^К | A282G; C874T*; C1062T* |
| EcbCA6, EcbCA27 | Магадан | |
| EcbCA43, EcbCA44 | Ола | |
| EcbCA8, EcbCA9, EcbCA26 | Магадан | T841C; A987G; G1000A |
| EcbCA36 | Детрин ^К | |
| EcbCA50–EcbCA73 | Среднекан ^К | |
| EcbCA18, EcbCA45, EcbCA49 | Ола | |
| EcbCA46 | Магадан | C444T; G585A; C996T |
| EcbCA7, EcbCA10, EcbCA19 | Магадан | |
| EcbCA35, EcbCA41, EcbCA42 | Детрин ^К | A303G; T318C; T990C |

Примечание: * – транзигция в первой позиции кодона; ^К – река бас. р. Колыма.

гаплотипы EcbCA1, EcbCA3 и EcbCA20. В окрестностях г. Магадан обнаружены полевки с нуклеотидной последовательностью EcbCA3 (Переверзева и др., 2022). Следует отметить, что несколько одинаковых замен обнаружено в нуклеотидных последовательностях у ряда гаплотипов *cytb* у особей *A. oeconomus*, обитающих как в Северном Охотоморье, так и в бас. р. Колыма, что, по-видимому, указывает на общность их происхождения. Учитывалось наличие минимум трех идентичных замен (за исключением C1122T), данные представлены в табл. 3.

Филогенетические отношения между группами сходных по нуклеотидной последовательности EcbCA-гаплотипов с указанием мест обитания их носителей, представлены на NJ-дендрограмме (рис. 5). Сопоставление всех нуклеотидных замен гаплотипов EcbCA полевок-экономок Северного Охотоморья (Переверзева и др., 2022) и бас. р. Колыма показывает сложное формирование EcbCA-генофондов популяций *A. oeconomus*. Полученные результаты позволяют предположить расселение этого вида по крайней мере из двух рефугиумов после максимума Сарганского оледенения. В одном, располагавшемся, вероятно, на территории Западного Приохотья, – сохранились особи с нуклеотидной последовательностью *cytb*, близкой к таковой EcbCA1. С окончанием оледенения их потомки расселились по Северному Охотоморью и проникли в бас. р. Колыма. На рис. 5 группы данных гаплотипов с обозначением мест отлова их носителей представлены кладой I. Топология клады с большой вероятностью показывает наличие родоначальной ветви полевок, за-

селивших охотоморское побережье, а также о-ва Талан и Недоразумения и распространившихся по бас. р. Кулу. Данная ветвь клады I включает нуклеотидные последовательности особей, отловленных вблизи пос. Охотск (EcbCA13, EcbCA15, EcbCA17), пос. Армань (EcbCA1, EcbCA13), г. Магадан (EcbCA2, EcbCA34, EcbCA47), пос. Ола (EcbCA12), на о-вах Недоразумения (EcbCA11, EcbCA12), Талан (EcbCA4, EcbCA5) и в бас. р. Кулу (EcbCA1, EcbCA23–EcbCA25, EcbCA37–EcbCA40). Можно предположить, что предки этих *A. oeconomus* дали начало полевок-экономкам, EcbCA-гаплотипы которых образуют две субклады: носители одной заселяют в настоящее время окрестности г. Магадан (EcbCA2, EcbCA3, EcbCA6, EcbCA27), поселков Атарган (EcbCA48), Армань (EcbCA3), Ола (EcbCA43, EcbCA44) и бас. р. Кулу (EcbCA3); носители гаплотипов второй субклады найдены возле г. Магадан (EcbCA7, EcbCA10, EcbCA18, EcbCA19, EcbCA46), у пос. Ола (EcbCA45, EcbCA49) и в бас. р. Детрин (EcbCA35, EcbCA41, EcbCA42).

Можно предположить, что из второго крупного рефугиума, располагавшегося в районе бас. р. Среднекан и, возможно, р. Детрин, полевки-экономки распространились в бас. р. Омолон и окрестности г. Магадан. В настоящее время нуклеотидные последовательности EcbCA50–EcbCA73 (определены у экземпляров, отловленных в бас. р. Среднекан), EcbCA36 (бас. р. Детрин), EcbCA29, EcbCA31, AY305213, AY305232 (бас. р. Омолон), EcbCA8, EcbCA9, EcbCA26 (г. Магадан) и EcbCA14, EcbCA16 (пос. Охотск) имеют схожее строение. На рис. 5



Рис. 5. NJ-дендрограмма филогенетических отношений между схожими по нуклеотидной последовательности группами гаплотипов гена цитохрома *b* полевки-экономки центральноазиатской клады с указанием мест отлова. * — реки бас. р. Колыма. Масштабный отрезок соответствует числу нуклеотидных замен на один сайт.

группы этих гаплотипов с обозначением мест отлова их носителей образуют кладу II.

Основываясь на топологии дерева филогенетических отношений между группами сходных по нуклеотидной последовательности *EcbSA*-гаплотипов можно сделать предположение о сложной истории формирования *EcbSA*-генофондов исследуемых популяций *A. oesonotus* Северного Охотоморья и бас. р. Колыма. Возможно, после сохранения в рефугиумах, полевки-экономки могли оказаться по различным причинам в более мелких изолированных сообществах. Формирование генофондов этих обособленных популяций зависело изначально от ограниченного числа вариантов нуклеотидных последовательностей *cytb* особей-основателей. В дальнейшем мутационный, стохастический процессы и отбор привели к образованию различных генофондов. При возникновении благоприятных для экспансии условий, произошло широкое расселение вида. Полевки из Западного Приохотья заняли не только побережье Северного Охотоморья, но и бас. рр. Кулу и Детрин. Из колымского рефугиума часть особей достигла не только окрестностей г. Магадан, но и пос. Охотск.

Характеристика гаплотипов *cytb* в выборках из популяций полевки-экономки Чукотки и Аляски

На территории южного побережья Чаунской губы отловлено всего четыре полевки-экономки берингской клады. Нуклеотидные последовательности *cytb* этих особей различаются пятью заменами и представлены тремя гаплотипами. Значения индексов молекулярного разнообразия этой и *EcbSA*-выборок полевки из бас. р. Колыма имеют один порядок (табл. 1). Полученный результат косвенно свидетельствует о высоком уровне полиморфизма нуклеотидной последовательности *cytb* особей *A. oesonotus* берингской клады, обитающих на Чукотке. Для адекватной оценки структуры генофонда популяции полевки-эконом-

ки, заселяющей данную часть ареала, требуются дальнейшие исследования.

Выборка с Аляски представлена 28 образцами *cytb* особей, отловленных Н.Е. Докучаевым в 2008 г., и 9 нуклеотидными последовательностями, взятыми в анализ из данных базы GenBank (Galbreath, Cook, 2004). На рис. 3 показано распределение *EcbBr*-гаплотипов этой группы полевки. Наиболее представлен вариант *EcbBr*20, совпадающий с AY305130. Нуклеотидная последовательность гаплотипа *EcbBr*24, второго по доле в выборке, одинакова с AY305100, AY305124, AY305125 и AY305131. Вариант *EcbBr*22 идентичен AY305128 и AY305129. Носителей AY305126 и AY305127 в совокупности полевки-экономки, отловленных в 2008 г., не найдено. Следует отметить, что в данной выборке *A. oesonotus*, представленной достаточным количеством особей, обнаружено всего шесть *cytb*-гаплотипов, каждый из которых отличается от остальных *cytb*-вариантов полевки из этой группы одной заменой (рис. 2). Небольшой уровень полиморфизма нуклеотидной последовательности *cytb* полевки этой выборки отражается в самых низких значениях P_i , h и π . Параметры P_i и π в выборке полевки с Аляски втрое меньше, чем в других группах этого вида, состоящих из особей одной генетической клады — *EcbSA* или *EcbBr* (табл. 1).

Филогенетические отношения *EcbBr*-гаплотипов *cytb* в выборках из популяций полевки-экономки Северного Охотоморья, бас. р. Колыма, Чукотки и Аляски

Для определения филогенетических отношений *EcbBr*-гаплотипов полевки-экономки анализируемых популяций построена медианная сеть по принципу минимального числа нуклеотидных замен (рис. 6). Полученная диаграмма наглядно демонстрирует высокий уровень полиморфизма и сложные филогенетические отношения гаплотипов.

типов *cytb* *A. oeconomus* EcbBr-клады. Четко представлены шесть обособленных достаточно крупных субклад и небольшой субкластер, включающий гаплотипы EcbBr12 и EcbBr14. В предыдущей работе (Переверзева и др., 2022), анализируя топологию ML-филогенетического дерева *cytb*-гаплотипов, мы обсуждали особенности филогенетических отношений вариантов нуклеотидной последовательности *cytb* полевок-экономок Северного Охотоморья. На медианной сети наглядно продемонстрированы взаимосвязи анализируемых EcbBr-*cytb*-гаплотипов. Возле пос. Эвенск и в бас. р. Омолон отловлены особи двух отдаленных субкластеров, один из которых представлен гаплотипами EcbBr12 и EcbBr14, наиболее близкими по последовательности нуклеотидов к полевкам, отловленным на Аляске. Субкластер *cytb*-гаплотипов полевок, пойманных на Аляске, имеет радиальную структуру с предковым вариантом EcbBr24. Это свидетельствует о монофилетическом происхождении популяции *A. oeconomus*, обитающей на этой территории. Можно предположить, что часть отдаленных предков (носителей гипотетического гаплотипа mv8) полевок этих двух сублиний мигрировала по берингийскому мосту в Северную Америку, а другая — осталась на Евразийском континенте и сохранилась в рефугиуме (предположительно в районе Пенжинской губы). В результате мутаций и микроэволюционных процессов, имевших место за время географической изоляции этих двух линий потомков mv8, образовались два субкластера *cytb*-вариантов. В пользу данного предположения свидетельствует сходство нуклеотидных последовательностей гена *cytb* *A. oeconomus*, обитающих на Аляске, в окрестностях пос. Эвенск и в бас. р. Омолон. Гаплотипы EcbBr12 и EcbBr24 разнятся между собой шестью нуклеотидными заменами, и от EcbBr1 они также отличаются шестью одинаковыми мутациями (рис. 7). Следует отметить, что генетическая клада EcbCA имеет наибольшее сходство с носителями сублинии EcbBr12 и EcbBr14, на что указывает структура медианной сети. Возможно, это самая древняя ветвь EcbBr-клады. Другие варианты последовательности нуклеотидов *cytb* полевок, обитающих вблизи пос. Эвенск и в бас. р. Омолон (EcbBr15–EcbBr17, AY305186) образуют субкладу с предковым гаплотипом EcbBr13. Варианты EcbBr12 и EcbBr15 различаются четырнадцатью мутациями (рис. 7). Можно предположить, что генетический профиль данных субклад сформирован в разных рефугиумах. Генофонд полевок этих изолированных групп, возможно, определился синергией эффекта основателя, мутационного и стохастических процессов на фоне прессинга отбора. В дальнейшем, в постледниковый период, произошло расселение и смешение полевок из этих двух рефугиумов, о чем свидетельствует присутствие EcbBr12 и EcbBr16 у особей, отловленных на северном побережье

Охотского моря и в бас. р. Омолон. Исходя из топологии медианной сети, можно предположить, что дальнейшая экспансия *A. oeconomus*, мутационный и микроэволюционные процессы стали причиной субкластерной структуры генофонда этого вида на территории Северо-Восточной Азии. Три транзиции и одна трансверсия в третьей позиции кодона привели к образованию гипотетического mv11, от которого произошли полевки, заселившие побережье Северного Охотоморья. Две транзиции и трансверсия в третьей позиции кодона в нуклеотидной последовательности mv11 привели к появлению mv4, родоначальнику вариантов EcbBr18, EcbBr19 и EcbBr26, обнаруженных у особей Чукотки. Кроме того, от mv11 посредством трех транзиций в третьей позиции кодона произошел mv9. Одна ветвь последнего, предположительно, дала начало особям, освоившим п-ов Камчатка и отделившийся от его территории о. Парамушир (Переверзева и др., 2022), а другая — особям, освоившим Аляску, окрестности пос. Эвенск и бас. р. Омолон.

Особенности филогенетических отношений *cytb*-гаплотипов *A. oeconomus* п-ова Камчатка и о. Парамушир подробно обсуждались нами в предыдущей работе (Переверзева и др., 2022). Расположение на медианной сети гаплотипов полевок, отловленных на данных территориях, подтверждают полученные ранее результаты.

На роль предкового гаплотипа в субкластере полевок-экономок западной части Северного Охотоморья, с практически радиальной структурой, претендуют EcbBr1 и EcbBr3. С учетом количества замен, которыми различаются эти нуклеотидные последовательности и гипотетический mv11, а также структуру самого субкластера, представляется более вероятным происхождение данного субкластера от EcbBr3.

Характеристика EcbBr-гаплотипов cytb в выборках из популяций полевки-экономки Северного Охотоморья, бас. р. Колыма, Чукотки и Аляски

При сопоставлении нуклеотидных последовательностей *cytb* полевок генетической линии EcbBr, отловленных на территориях Северного Охотоморья (Переверзева и др., 2022), в бас. р. Колыма, на Чукотке и Аляске обнаружен ряд особенностей (рис. 7). Все замены рассматривались относительно нуклеотидной последовательности *cytb* гаплотипа EcbBr3. У *A. oeconomus* EcbBr-клады западного участка Северного Охотоморья (г. Магадан, пос. Ола, Атарган и о. Уратамлян) определено 14 гаплотипов, различающихся между собой 22 мутациями. Количество нуклеотидных замен, отличающих EcbBr-гаплотипы полевок из этих выборок, колеблется от одной (EcbBr1 и EcbBr3) до семи (EcbBr4 и EcbBr5 с EcbBr3). Из всех гаплотипов полевок западной части Северного

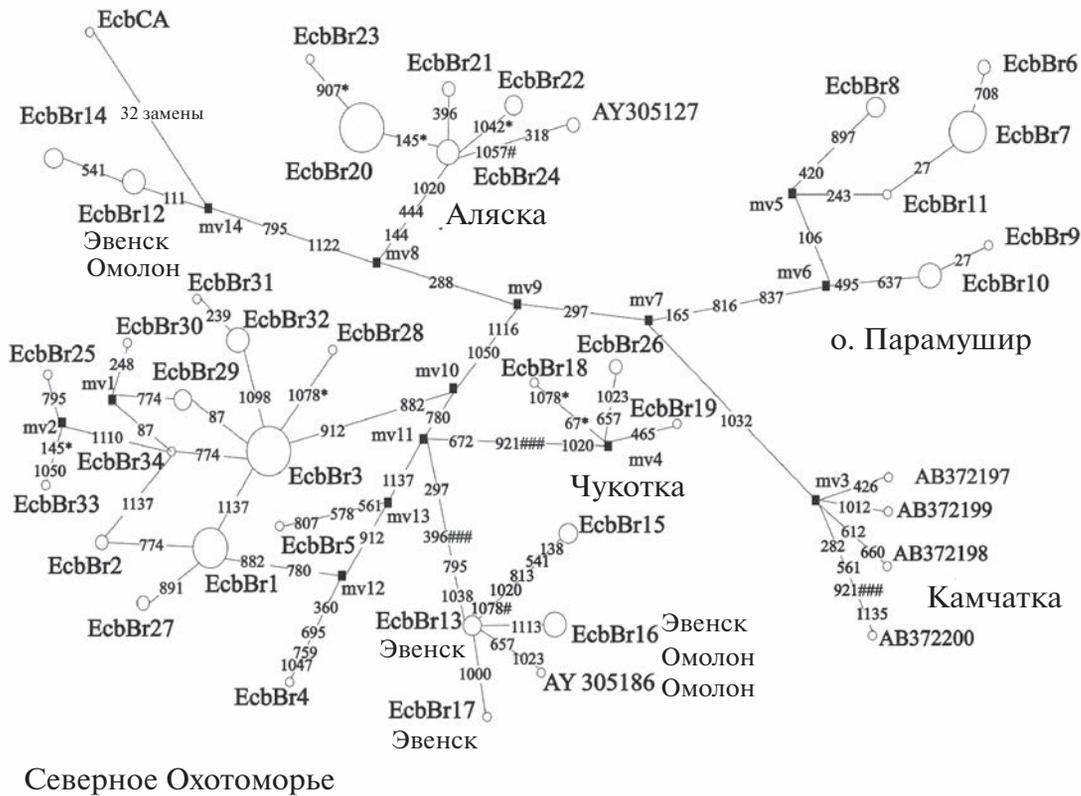


Рис. 6. Медианная сеть гаплотипов гена цитохрома *b* полевки-экономки берингийской клады популяций Северо-Восточной Азии и Аляски. Размер кругов пропорционален частоте варианта мТДНК. * – транзигция в 1-й позиции кодона, # – трансверсия в 1-й позиции кодона, ### – трансверсия в 3-й позиции кодона. Цифрами обозначены сайты мутаций от начала гена цитохрома *b*; mv – медианный вектор.

Охотоморья только нуклеотидные последовательности EcbBr4 и EcbBr5, расположенные на медианной сети несколько обособленно (рис. 6), имеют транзигцию в третьей позиции кодона G882A; кроме того, EcbBr5 содержит аналогичную замену G912A (рис. 7). Следует обратить внимание, что данные мутации присутствуют в нуклеотидных последовательностях всех особей, населяющих восточные территории Северного Охотоморья (окрестности пос. Эвенск), п-ов Камчатка, о. Парамушир, а также верховья р. Омолон, Чукотку и Аляску. По-видимому, еще до оледенения в *cytb* *A. oeconomus* берингийской генетической линии произошли транзигции в третьем нуклеотиде кодона A882G и A912G. В пользу именно такой направленности мутаций свидетельствует присутствие аденина в данных сайтах у всех особей EcbBr-клады, кроме отловленных в окрестностях г. Магадан, пос. Ола и пос. Атарган и на о. Уратамлян. Кроме того, транзигция в третьей позиции кодона C780T, найденная в нуклеотидной последовательности EcbBr4 и EcbBr5, присутствует во всех *cytb*-гаплотипах полевков, отловленных на побережье Чаунской губы, в

окрестностях пос. Эвенск и бас. р. Омолон (субклада EcbBr13, EcbBr15–EcbBr17, AY305186) (рис. 6, 7).

У полевков-экономок, пойманных в окрестности пос. Эвенск, на Камчатке, на о. Парамушир, в бас. р. Омолон, на Чукотке и Аляске, определено 26 EcbBr-гаплотипов, отличающихся 53 мутациями в 51 сайте. Количество замен, различающих эти нуклеотидные последовательности, колеблется от одной (между EcbBr6 и EcbBr7 – оба гаплотипа выявлены у полевков о. Парамушир) до восемнадцати (EcbBr6 и EcbBr15, последний найден у полевков из окрестностей пос. Эвенск). Следует отметить, что у всех исследованных EcbBr-особей из этих популяций обнаружены, как отмечено выше, транзигции в третьей позиции кодона G882A и G912A. У всех полевков п-ова Камчатка, о. Парамушир, окрестностей пос. Эвенск и бас. р. Омолон, кроме EcbBr12 и EcbBr14, найдена аналогичная замена G297A. Кроме того, в нуклеотидной последовательности гена *cytb* всех исследованных особей *A. oeconomus* Камчатки, о. Парамушир, Аляски и носителей гаплотипов EcbBr12 и EcbBr14 имеют место транзигции в третьей позиции кодона T1050C и C1116T.

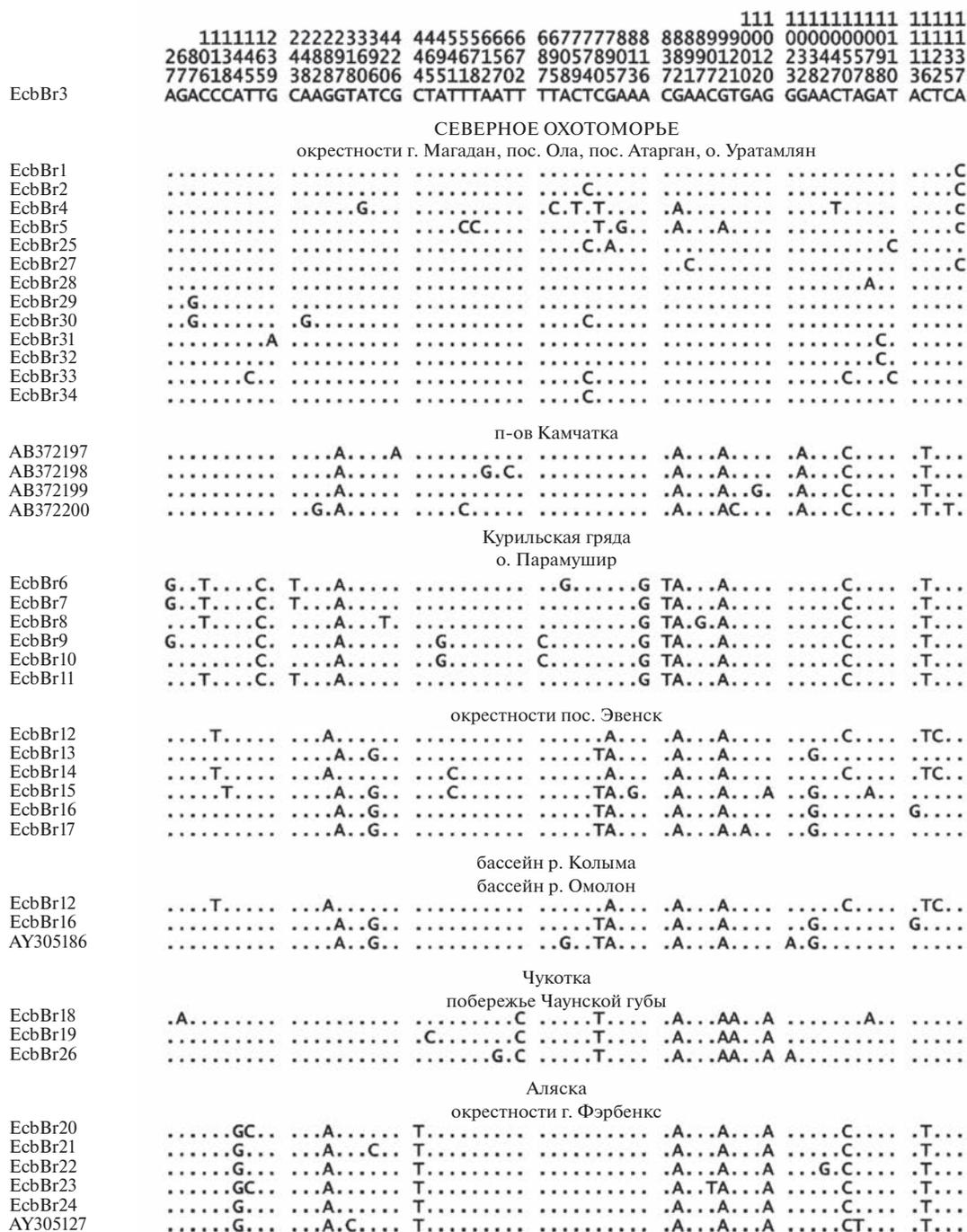


Рис. 7. Гаплотипы гена цитохрома *b* полевки-экономки берингийской клады из популяций Северного Охотоморья, бас. р. Колыма и Аляски. Нуклеотидные замены представлены относительно последовательности варианта EcbBr3. Замены показаны от начала гена цитохрома *b*.

Варианты AB372197–AB372200 (Iwasa et al., 2009) полевок-экономок, отловленных на Камчатке, отличаются от остальных исследованных гаплотипов транзицией в третьей позиции кодона G1032A. Топология их взаимного расположения на медианной сети (рис. 6) и наличие восьми за-

мен (рис. 7) косвенно свидетельствуют о высокой степени полиморфизма нуклеотидной последовательности *cytb* *A. oesotomus*, населяющих Камчатку. В предыдущей публикации (Переверзева и др., 2022) нами детально обсуждались особенности *cytb*-гаплотипов полевок-экономок о. Парамушир.

В генофонде полевков этой популяции найдено шесть уникальных гаплотипов, различающихся между собой восьмью нуклеотидными заменами.

Следует отметить, что только у экономок, отловленных на Чукотке, обнаружены в третьей позиции кодона транзигция T672C и трансверсия T921A. У всех изученных полевков, отловленных на Чукотке и Аляске, и только у носителей гаплотипа EcbBr15 из окрестностей пос. Эвенск присутствует транзигция в третьей позиции кодона нуклеотидной последовательности *cytb* G1020A. Только у всех особей, добытых в районе Чаунской губы, и части полевков, отловленных в окрестностях пос. Эвенск (носителей гаплотипов EcbBr13, EcbBr15–EcbBr17, общая доля в выборке – 0.5882), найдена транзигция в третьей позиции кодона C780T. Кроме того, эти экземпляры имеют в сайте 1116 цитозин, как и EcbBr1, остальные исследованные EcbBr-полевки в данной третьей позиции кодона содержат тимин.

У всех полевков-экономок, пойманных на Аляске, как и у особей с Камчатки и о. Парамушир, а также у экземпляров EcbBr12 и EcbBr14 из окрестностей пос. Эвенск, присутствует транзигция в третьей позиции кодона T1050C. Кроме того, только в нуклеотидной последовательности *cytb* всех полевков, отловленных на Аляске, а также EcbBr12 и EcbBr14, имеет место транзигция в третьей позиции кодона G288A. Особенностью добытых на Аляске *A. oeconotus* является наличие у всех особей в нуклеотидной последовательности *cytb* транзигции в третьей позиции кодона A144G и C444T.

Разнообразие гаплотипов гена cytb в филогруппах EcbCA и EcbBr полевков-экономок Северо-Восточной Азии и Аляски

В табл. 1 показаны характеристики молекулярного разнообразия филогрупп *A. oeconotus*. Следует отметить, что количество отловленных в бас. р. Колыма особей клады EcbCA вдвое превышает число экземпляров генетической линии EcbBr, добытых в бас. р. Омолон, на Чукотке и Аляске. При этом EcbCA-*cytb*-гаплотипов в 4.25 раза больше, чем вариантов EcbBr. Варибельных сайтов в гаплотипах EcbCA-линии в 2 раза больше, чем у совокупности вариантов EcbBr-филогруппы. Индексы молекулярного разнообразия у клады EcbCA одного порядка с EcbBr, но несколько выше по значению. По-видимому, данный результат отражает достаточно высокий уровень полиморфизма EcbBr-*cytb*-гаплотипов полевков-экономок из выборок бас. р. Омолон и Чаунской губы, при небольшой численности последней, а также низком разнообразии последовательности нуклеотидов этого гена в EcbBr-выборке с Аляски, самой большой по численности в проводимом анализе.

В Северном Охотоморье EcbCA- и EcbBr-полевки представлены примерно одинаково. Сравнение совокупных выборок полевков-экономок бас. р. Колыма, Аляски и Северного Охотоморья

выявило один порядок значений индексов молекулярного разнообразия в обеих группах. В сумме у *A. oeconotus* исследовано 73 EcbCA-гаплотипа, определенных нами, и семь, взятых из базы данных GenBank, различающихся 74 нуклеотидными заменами в 73 сайтах. Найдено 34 варианта EcbBr-клады в нашей работе и привлечено шесть гаплотипов этой генетической линии из базы данных GenBank, которые отличаются 68 заменами в 66 сайтах. В общей сложности в нуклеотидной последовательности *cytb* у полевков-экономок обеих клад обнаружена 231 замена в 226 сайтах. Количество *cytb*-гаплотипов у полевков-экономок бас. р. Колыма, Чукотки и Аляски в 2.3 раза меньше числа исследованных особей. Для Северного Охотоморья данное соотношение составляет 3.5. Отношения количества *cytb*-гаплотипов к числу варибельных сайтов для выборки *A. oeconotus* бас. р. Колыма, Чукотки и Аляски – 0.7241, для совокупности особей Северного Охотоморья – 0.6042. Несколько более высокие значения индексов молекулярного разнообразия *A. oeconotus* Северного Охотоморья отражают отсутствие в этой выборке большего, чем в бас. р. Колыма, числа смешанных EcbCA–EcbBr-популяций. Полученные результаты свидетельствуют о высоком уровне генетического разнообразия полевков-экономок Северо-Восточной Азии в целом.

Генетическая дифференциация исследованных популяций полевков-экономок Северо-Восточной Азии и Аляски

Следует отметить, что, кроме обсуждаемых выше гаплотипов EcbBr12, EcbBr16, EcbCA1, EcbCA3 и EcbCA20, других одинаковых *cytb*-гаплотипов, типированных у полевков-экономок, обитающих в Северном Охотоморье, в бас. р. Колыма, на Чукотке и Аляске, не выявлено.

Рассчитаны генетические дистанции (популяционные попарные *Fst*) между исследованными выборками *A. oeconotus*. Наибольшее различие нуклеотидных последовательностей гена *cytb* EcbCA-особей, обитающих в бас. р. Детрин, и EcbBr-полевков Аляски – *Fst* = 0.9565; наименьшее – *Fst* = 0.1763 – между EcbCA-экземплярами бас. р. Кулу и EcbCA/EcbBr-носителями бас. р. Омолон. Все выборки из исследованных популяций генетически различаются с высокой степенью достоверности ($p = 0.00 \pm 0.00$), что свидетельствует об изоляции сопоставляемых популяций полевков-экономок Северо-Восточной Азии и Аляски.

В пакете программ AMOVA методом попарной дифференциации рассчитана генетическая изменчивость групп популяций *A. oeconotus*, составленных по географическому критерию (рис. 1). В первую группу вошла выборка экономок бас. р. Колыма; во вторую – с побережья Чаунской губы; в третью – с Аляски. При таком объединении доля межгрупповой генетической изменчивости

оказалась наибольшей и составила 66.34%, внутрigrупповая доля – 15.44% и внутрипопуляционная – 18.22%. По-видимому, полученный результат является следствием сопоставления трех популяций полевков-экономок EcbSA-клады (бас. рр. Кулу, Детрин, Среднекан), двух выборок, представленных особями EcbBr-линии (Чукотка и Аляска) и одной, состоящей из экземпляров EcbSA и EcbBr этого вида (бас. р. Омолон). При включении в расчеты популяций *A. oeconomus* Северного Охотоморья – группы континентального участка (окрестности г. Магадан и поселков Ола, Атарган, Охотск, Эвенск), четырех островов, каждого отдельно (Недоразумения, Талан, Уратамлян и Парамушир) и п-ова Камчатка – результат изменяется. Доля межгрупповой генетической изменчивости составила 33.34%, внутрigrупповой – 31.58% и внутрипопуляционной – 35.08%. Полученные результаты отражают высокий уровень изменчивости нуклеотидной последовательности *cytb* у *A. oeconomus*, населяющих Северо-Восточную Азию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У полевков-экономок Северо-Восточной Азии и Аляски найдено 63 гаплотипа гена *cytb* (51 вариант EcbSA и 12 модификаций EcbBr), различающихся между собой 94 мутациями. Подтверждено, что в бас. р. Омолон обитает смешанная EcbSA/EcbBr-популяция этого вида. Верховья р. Колыма (бас. рр. Кулу, Детрин и Среднекан) заселены полевками EcbSA-клады. На о. Парамушир, на Камчатке, Чукотке и Аляске найдены особи только EcbBr-генетической линии. Проведенный анализ показал достоверно высокий уровень генетических дистанций ($p = 0.00 \pm 0.00$) между данными выборками. В общей сложности, с учетом результатов предыдущего исследования (Переверзева и др., 2022) в нуклеотидной последовательности гена *cytb* у полевков-экономок обеих клад обнаружена 231 замена в 226 сайтах. При сопоставлении всех исследованных популяций, включая населяющих Северное Охотоморье, доли межгрупповой, внутрigrупповой и внутрипопуляционной генетической изменчивости практически равны. Индексы молекулярного разнообразия указывают на высокий уровень полиморфизма нуклеотидных последовательностей гена *cytb* у полевков-экономок Северо-Восточной Азии. Наименьшее генетическое разнообразие найдено у особей Аляски. Значения индексов молекулярного разнообразия указывают на стабильность популяций, имеющих в течение длительного времени высокое значение эффективной численности. Полученные результаты свидетельствуют о сложной истории расселения этого вида по территории Северо-Восточной Азии. По-видимому, *A. oeconomus* как EcbBr-, так и EcbSA-генетических клад в период оледенений сохранялись в нескольких рефугиумах. Предполагательно, в результате синергии эффекта основателя, отбора и микроэволюционных процессов в различных изолированных

популяциях полевков-экономок сформировались отличающиеся генофонды. Возможно, в дальнейшем особи из одного рефугиума в результате ряда причин вновь оказывались в разных изолированных популяциях на время, достаточное для образования специфических генофондов. Впоследствии в благоприятных для экспансии условиях размножившиеся полевки-экономки расселились по всей обширной территории Северо-Восточной Азии. Произошло заселение одних и тех же локальностей особями различных EcbSA- и EcbBr-сублиний, а также образование смешанных EcbSA/EcbBr-популяций. Примечательно, что одинаковые гаплотипы обнаружены у полевков, отловленных в географически удаленных точках – окрестностях пос. Эвенск и бас. р. Омолон (EcbBr12, EcbBr16) и пригороде г. Магадан, пос. Армань и бас. р. Кулу (EcbSA1, EcbSA3, EcbSA20), что свидетельствует об интенсивности прошедшей экспансии. В настоящее время сформировались генетически изолированные популяции *A. oeconomus* с высоким полиморфизмом нуклеотидной последовательности гена *cytb*, что указывает на благоприятное существование вида на данном участке обширного ареала.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследования проведены в ходе выполнения государственного задания по теме “Млекопитающие Арктики и Субарктики: структура и динамика сообществ, проблемы охраны” № гос. регистрации АААА-А18-118010990006-3 (Институт биологических проблем Севера ДВО РАН).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в процессе исследования соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Воронцов Н.Н., Ляпунова Е.А., Боевский Г.Г., Ревин Ю.В. Стабильность кариотипа полевки-экономки (*Microtus oeconomus*) в центральной части ареала и история становления современного ареала вида // Зоол. журн. 1986. Т. 65. № 11. С. 1705–1715.
- Костенко В.А. Грызуны (Rodentia) Дальнего Востока России. Владивосток: Дальнаука, 2000. 210 с.
- Костенко В.А., Нестеренко В.А., Трухин А.М. Млекопитающие Курильского архипелага. Владивосток: Дальнаука, 2004. 186 с.
- Макариков А.А., Докучаев Н.Е., Коняев С.В. Цестоды грызунов Северного Приохотья // Вестн. СВНЦ ДВО РАН. 2016. № 4. С. 52–61.
- Переверзева В.В., Примак А.А., Докучаев Н.Е. и др. Изменчивость гена цитохрома *b* мтДНК красносерой полевки (*Craseomys rufocanus* Sundevall, 1846)

- Северного Приохотья и бассейна р. Колыма // Вестн. СВНЦ ДВО РАН. 2018. № 1. С. 101–112.
- Переверзева В.В., Докучаев Н.Е., Примак А.А. и др. Изменчивость гена цитохрома *b* мтДНК полевки-экономки (*Alexandromys oeconomus* Pallas, 1776) Северного Охотоморья // Успехи соврем. биол. 2022. Т. 142. № 1. С. 90–104.
- Чернявский Ф.Б. Млекопитающие крайнего северо-востока Сибири. М.: Наука, 1984. 389 с.
- Юдин Б.С., Кривошеев В.Г., Беляев В.Г. Мелкие млекопитающие севера Дальнего Востока. Новосибирск: Наука, 1976. 270 с.
- Abramson N.I., Tikhonova E.P. Reevaluation of taxonomic structure of the root vole (*Microtus oeconomus* Pallas, 1776, Rodentia, Arvicolidae) from the territory of the former USSR based on evidence from craniometric and molecular data // Russ. J. Theriol. 2005. V. 4. № 1. P. 63–73.
- Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. P. 37–48.
- Brunhoff C., Galbreath K.E., Fedorov V.B. et al. Holarctic phylogeography of the root vole (*Microtus oeconomus*): implications for late quaternary biogeography of high latitudes // Mol. Ecol. 2003. V. 12. № 4. P. 957–968.
- Brunhoff C., Yoccoz N.G., Ims R.A., Jaarola M. Glacial survival or late glacial colonization? Phylogeography of the root vole (*Microtus oeconomus*) in north-west Norway // J. Biogeogr. 2006. V. 33. P. 2136–2144.
- Dabrowski M.J., Pomorski J.J., Gliwicz J. Cytochrome *b* gene (*cytb*) sequence diversity in a *Microtus oeconomus* population from Bialowieza Primeval Forest // Acta Theriol. 2013. V. 58. P. 119–126.
- Fink S., Fischer M.C., Excoffier L., Heckel G. Genomic scans support repetitive continental colonization events during the rapid radiation of voles (Rodentia: *Microtus*): the utility of AFLPs versus mitochondrial and nuclear sequence markers // Syst. Biol. 2010. V. 59. № 5. P. 548–572.
- Galbreath K.E., Cook J.A. Genetic consequences of Pleistocene glaciations for the tundra vole (*Microtus oeconomus*) in Beringia // Mol. Ecol. 2004. V. 13. P. 135–148.
- Hassanin A., Lecointre G., Tillier S. The “evolutionary signal” of homoplasy in protein-coding gene sequences and its consequences for *a priori* weighting in phylogeny // Compt. Rend. Acad. Sci. Paris. 1998. V. 321. № 7. P. 611–620.
- Haring E., Sheremetyeva I., Kryukov A. Phylogeny of Palearctic vole species (genus *Microtus*, Rodentia) based on mitochondrial sequences // Mamm. Biol. 2011. V. 76. № 3. P. 258–267.
- Jancewicz E., Falkowska E., Ratkiewicz M. mtDNA evidence for a local northern latitude Pleistocene refugium for the root vole (*Microtus oeconomus*, Arvicolinae, Rodentia) from Eastern Poland // J. Zool. Syst. Evol. Res. 2015. V. 53. № 4. P. 331–339.
- Iwasa M.A., Kostenko V.A., Frisman L.V., Kartavtseva I.V. Phylogeography of the root vole *Microtus oeconomus* in Russian Far East: a special reference to comparison between Holarctic and Palaearctic voles // Mamm. Study. 2009. V. 34. P. 123–130.
- Kryštufek B., Shenbrot G.I. Voles and lemmings (Arvicolinae) of the Palaearctic region. Maribor: Univerzitetna založba, 2022. 437 p.
- Lisovsky A.A., Petrova T.V., Yatsenyuk S.P. et al. Multilocus phylogeny and taxonomy of East Asian voles *Alexandromys* (Rodentia, Arvicolinae) // Zool. Scripta. 2018. V. 47. Iss. 1. P. 9–20.
- Nei M. Molecular evolutionary genetics. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1987. 495 p.
- Nei M., Kumar S. Molecular evolution and phylogenetic. N.Y.: Oxford Univ. Press, 2000. 333 p.
- Shenbrot G.I., Krasnov B.R. An atlas of the geographic distribution of the arvicoline rodents of the world (Rodentia, Muridae: Arvicolinae). Sofia: Pensoft Publishers, 2005. 336 p.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. MEGA-6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. P. 2725–2729.
- Zardoya R., Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates // Mol. Biol. Evol. 1996. V. 13. № 7. P. 933–942.

Variability of the Gene Cytochrome *b* mtDNA of the Tundra Vole (*Alexandromys oeconomus* Pallas, 1776) in North-Eastern Asia and Alaska

V. V. Pereverzeva^{a,*}, N. E. Dokuchaev^a, A. A. Primak^a, and E. A. Dubinin^a

^aInstitute of Biological Problems of the North, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Magadan, Russia

*e-mail: vvpereverzeva@mail.ru

The nucleotide sequence polymorphism and haplotype diversity of the cytochrome *b* gene in samples of the tundra vole (*Alexandromys oeconomus*) from North-Eastern Asia and Alaska were studied. 63 haplotypes of *cytb* gene (51 variants of Central Asian and 12 of Beringian genetic lineages), differing among themselves by 94 mutations, were found. The Upper Kolyma River is inhabited by voles of the Central Asian clade. Mixed population of this species in the basin of the Omolon River (right tributary of the Kolyma River) was found. In Chukotka and Alaska, only specimens of the Beringian phylogroup were found. Genetic differences between all samples are statistically significant. Genetic data of *A. oeconomus* populations of the Kolyma River basin, Alaska, and Northern Okhotomorje were compared. A total of 231 substitutions in 226 sites were found in the nucleotide sequence of cytochrome *b* mtDNA gene in voles from both clades. The values of molecular diversity indices testify to the stability of populations with a high value of effective abundance over a long period of time. An analysis of population gene pool formation was performed and a proposed reconstruction of the complex dispersal history of this species across North-Eastern Asia was proposed.

Keywords: root vole, *Alexandromys oeconomus*, cytochrome *b* (*cytb*) gene, genetic polymorphism, phylogenetic analysis, North-Eastern Asia, Alaska

УДК 58.04

ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ФОРМ ФУЛЛЕРЕНОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ НА МЕТАБОЛИЗМ РАСТЕНИЙ И УРОЖАЙНОСТЬ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

© 2023 г. О. В. Ямскова^{1,*}, Д. В. Курилов², И. В. Заварзин², М. С. Краснов¹, Т. В. Воронкова³

¹Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия

²Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

³Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, Москва, Россия

*e-mail: olga_yamskova@mail.ru

Поступила в редакцию 05.10.2022 г.

После доработки 28.11.2022 г.

Принята к публикации 29.11.2022 г.

Поиск эффективных и экологически безопасных регуляторов роста растений в современных условиях позволяет выявить и описать действие химических веществ на развитие растения, метаболические процессы, биомассу его различных частей и урожайность. Вещества, обладающие наименьшей токсичностью для живых организмов, представляют особый интерес в данной области. В частности, к таковым относятся фуллерены C_{60} , C_{70} и их производные. В настоящей работе описано воздействие как самих фуллеренов, так и их производных на рост растений, урожайность, а также наблюдаемые метаболические и морфологические изменения, их зависимость от способов обработки, от химического строения и количества вещества, используемого для обработки.

Ключевые слова: водорастворимые производные фуллерена, стимулятор роста растений, корневая обработка, некорневая обработка, стресс у растений

DOI: 10.31857/S0042132423020102, **EDN:** KMZXFR

ВВЕДЕНИЕ

Создание высокоэффективных экологически безопасных препаратов для повышения продуктивности и устойчивости агро- и экосистем – актуальная научно-прикладная задача. За минувшее десятилетие наметилась тенденция, направленная на изучение влияния, оказываемого наноматериалами (НМ) на рост и развитие растений (Nair et al., 2010; Rico et al., 2011; Aslani et al., 2014; Husen, Siddiqi, 2014; Zaytseva, Neumann, 2016). В этой связи в качестве перспективной основы для разработки агропрепаратов нового поколения привлекают внимание, в частности, в настоящее время широко применяемые в биомедицинских исследованиях и фармакологии водорастворимые производные фуллеренов.

Согласно существующей в химии классификации, фуллерены относятся к простым веществам, так как их молекулы состоят только из одного элемента – углерода. Таким образом, фуллерены являются аллотропной модификацией углерода (Curl, Smalley, 1988) и попадают в один ряд с другими известными его модификациями – графитом, алмазом, карбином и графеном. Хотя все перечисленные соединения состоят из углерода, но

они сильно различаются по своим свойствам. Так, алмаз характеризуется своей исключительной твердостью, а графит – слоистостью. Примечательно, что в отличие от других аллотропных форм углерода, фуллерены, обладая структурой полиэдра, представляют собой молекулярную форму существования углерода (Елецкий, Смирнов, 1991, 1993, 1995). Фуллерены C_{60} , C_{70} (а также молекулы высших фуллеренов – C_{76} , C_{78} , C_{80} , C_{82} , C_{84} и т.д.), конденсируются в кристаллы, относящиеся к типу молекулярных. Такие кристаллы характеризуются небольшой величиной энергии взаимодействия молекул. Это обусловлено тем, что связь между ними осуществляется сравнительно слабыми силами Ван-дер-Ваальса в противоположность ионным кристаллам, где главную роль играют кулоновские силы. Сольватированные в органических фазах фуллерены присутствуют в виде кластеров, или агрегатов, состоящих из нескольких молекул фуллерена, связанных посредством сил Ван-дер-Ваальса (Rudalevige et al., 1998).

Фуллерены, находящиеся в конденсированном (твердом, кристаллическом) состоянии, называют фуллеритами, а легирование фуллеритов металлическими и другими присадками переводит их в класс фуллеридов (Елецкий, Смирнов, 1995).

Важно отметить, что эффективность использования фуллеренов и их производных в биомедицинской сфере, а также в сельском хозяйстве в значительной степени определяется возможностью получения водорастворимых форм таких соединений. Решение задачи получения водорастворимых форм фуллерена оказалось возможным осуществить в трех направлениях: получением коллоидных водных дисперсий фуллерена (ВДФ), созданием комплексов фуллерена с гидрофильными соединениями и присоединением к нему гидрофильных групп. ВДФ – это коллоидный раствор, содержащий кластеры фуллеренов с широким распределением частиц по размерам. Фуллерены – C_{60} , C_{70} и другие гомологи – в свободном состоянии способны к образованию стабильных водных дисперсий – коллоидных растворов (Безмельницын и др., 1998; Мчедлов-Петросян, 2010; Andrievsky et al., 1995, 2002; Mchedlov-Petrossyan, 2013). В частности, исследован (Andrievsky et al., 1995, 2002) перенос фуллеренов C_{60} и C_{70} из органической фазы в водную с применением УЗ-излучения, причем в упомянутых работах впервые продемонстрирована возможность получения ВДФ с концентрацией порядка 10^{-5} М и размерами частиц $d \leq 220$ нм. Посредством широкого набора физико-химических методов получены данные, на основании которых, в частности на примере фуллерена C_{60} , сделан вывод о том, что основным механизмом стабилизации в водных растворах является образование супрамолекулярного комплекса гидратированного фуллерена – H_nFn (Andrievsky et al., 1999). В таком супрамолекулярном комплексе молекула фуллерена окружена сферическими слоями взаимодействующих друг с другом молекул воды (Andrievsky et al., 2005). В целом ВДФ можно рассматривать как систему упорядоченных сферических кластеров воды, где сам фуллерен выступает в роли стабилизатора этих кластеров (Andrievsky et al., 2005).

Несмотря на разнообразие примеров присутствия фуллеренов и их производным биологической активности, продемонстрированной в ходе большого числа биомедицинских исследований (Думпис и др., 2018), данные, касающиеся влияния фуллеренов на растения, весьма ограничены. Без преувеличения можно сказать, что это направление биологических и биохимических исследований в настоящее время находится только в начале своего развития. Однако потребность в биодegradуемых нетоксичных препаратах комплексного положительного действия делает актуальным поиск и разработку новых форм, обеспечивающих транспортировку в растения макро- и микроэлементов, а также физиологически активных соединений, обладающих свойствами адаптогенов и протекторов. Перспективы создания таких препаратов связывают с углеродными НМ, в частности с водорастворимыми производными

фуллеренов (Nair et al., 2010; Rico et al., 2011; Aslani et al., 2014; Husen, Siddiqi, 2014; Zaytseva, Neumann, 2016).

Пока особенности и механизмы влияния водорастворимых производных фуллеренов на растения в агро- и экосистемах практически не изучены. Установлено как позитивное (стимулирующее рост, развитие и продуктивность), так и негативное (сдерживающее рост) влияние водорастворимых производных фуллеренов.

Имеется лишь ограниченное число данных о влиянии фуллерена и его производных на прорастание семян. Так, найдено, что ВДФ C_{60} , или водная дисперсия (коллоидный раствор) фуллерена C_{60} , оказывает сортозависимое ростостимулирующее действие на семена и проростки яровой и озимой пшениц, выражающееся в активации метаболических процессов, повышении уровня эндогенной абсцизовой кислоты, а также проявляющееся в изменении формата морфологических признаков, в частности в увеличении количества устьиц листовой пластины проростка.

ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ ФУЛЛЕРЕНОВ И ИХ ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЙ

Выявлен ростостимулирующий эффект ВДФ C_{60} (в концентрации 10^{-9} М) при проращивании семян сорта мягкой яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. (Ямскова и др., 2019а): наблюдалось увеличение в среднем на 30%, по сравнению с контролем, длины корней и стеблей. Оптимизация онтогенетических процессов на стадии прорастания семени при использовании ВДФ C_{60} в полевом опыте позволила заметно увеличить продуктивность (в среднем на 10–25%) и урожайность (в среднем на 15%) пшеницы.

Исследованы (Ozfidan-Konakci et al., 2022а, 2022b) эффекты, оказываемые фуллереном на фотосинтетический аппарат (фотосистемы I и II), переходный период флуоресценции хлорофилла *a*, экспрессию генов хлоропластов, усвоение азота, а также влияние на устьичное движение, систему поглощения радикалов и связанную с аквапорином экспрессию генов в растениях кукурузы *Zea mays* L. в условиях кобальтового стресса. Отмечено, что углеродные наноструктуры – перспективные агенты для сельского хозяйства. Так, найдено, что водорастворимый фуллерен ВДФ C_{60} может быть применен в роли нового наноагента, модулирующего ответ растений на создавшиеся стрессовые условия. Однако, как отмечается, механизм, лежащий в основе воздействия фуллереносодержащих препаратов на растения в агро-экосистемах, остается неясным. Растения кукурузы подвергали экзогенному воздействию ВДФ в концентрациях 100, 250 и 500 мг/л в условиях кобальтового стресса (Co , 300 мкМ) в течение

трех дней. Вызванные кобальтовым стрессом отрицательные изменения относительной скорости роста растений, их водного статуса (в частности относительное содержание воды и осмотический потенциал), газообмена и устьичной регуляции, были устранены посредством воздействия ВДФ. В хлоропластах кукурузы кобальтовый стресс нарушает эффективность фотосинтеза и экспрессию генов, связанных с фотосистемами. Выяснено, что воздействие ВДФ с различными концентрациями приводит к улучшению эффективности функционирования фотосинтетического аппарата. Кроме того, кобальтовый стресс индуцирует накопление активных форм кислорода (АФК), что подтверждается специфичной для АФК флуоресценцией в защитных клетках, а также приводит к усилению генерации антиоксидантных ферментов – хлоропластной супероксиддисмутазы (СОД) и пероксидазы, вызывает повреждения в результате окисления в хлоропластах кукурузы, выражающиеся в увеличении содержания побочных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), в частности реактивной субстанции тиобарбитуровой кислоты – ТВАРС (thiobarbituric acid reactive substance). После воздействия кобальтового стресса применение ВДФ способствует уменьшению содержания перекиси водорода за счет вырабатываемой СОД, повышения активности каталазы САТ и пероксидазы РОХ. Применение ВДФ приводит к регенерации аскорбата AsA после стрессового воздействия за счет повышения активности монодегидроаскорбат-редуктазы MDHAR при всех исследуемых концентрациях ВДФ и дегидроаскорбатредуктазы DHAR только при концентрации ВДФ 100 мг/л. В подвергнутых стрессу проростках кукурузы при воздействии ВДФ в концентрациях 100 и 250 мг/л уменьшение содержания перекиси водорода происходит посредством протекания ферментативных и неферментативных процессов, связанных с аскорбат-глутатионовым циклом AsA–GSH при помощи поддержания и равновесия конверсии AsA, и равновесия глутатион/глутатион дисульфид – GSH/GSSG. Кроме того, эффект уменьшения действия стресса в результате обработки ВДФ в концентрации 500 мг/л можно объяснить повышением метаболической активности изофермента глутатион-S-трансферазы GST и регенерацией AsA. Применение ВДФ позволяет уменьшать ингибирующее воздействие кобальтового стресса на усвоение азота. В хлоропластах кукурузы в результате обработки ВДФ наблюдается увеличение активности ферментов, которые обеспечивают превращение неорганического азота в органический – нитратредуктазу NR (фермент азотного обмена), глутаматдегидрогеназу GDH (регуляторный фермент аминокислотного обмена), нитритредуктазу NiR (фермент, превращающий окисленные формы азота в аммиак), глутаминсинтетазу GS (фер-

мент, катализирующий конденсацию глутамата и аммиака в глутамин). При этом токсичность ионов аммония NH_4^+ устраняется посредством ферментов GS и GDH, а не при помощи оксидоредуктазы – глутамат-синтазы GOGAT (глутаминоксоглутарат-аминотрансфераза). Повышенная активность ферментных систем: никотинамидадениндинуклеотид (окисленный) – глутаматдегидрогеназа NAD–GDH (дезаминирующей) и никотинамидадениндинуклеотид (восстановленный) – глутаматдегидрогеназа NADH–GDH (аминирующей), играющих важную роль в процессах клеточного дыхания и фосфорилирования, указывает на то, что фермент GDH необходим больше для устранения токсичности NH_4^+ . Следовательно, воздействие ВДФ на растения кукурузы, подвергшиеся стрессу, может играть определенную роль в метаболизме азота. Экзогенный водорастворимый фуллерен предположительно способствует устранению токсичности кобальта посредством увеличения экспрессии генов белков реакционных центров фотосистем, повышения уровня ферментов, связанных с системой защиты, а также улучшения усвоения азота в хлоропластах кукурузы.

На примере ботанического вида – табак Бен-тама *Nicotiana benthamiana* Domin – обнаружено, что углеродные НМ могут подавлять инфекцию, вызванную ВТМ (вирусом табачной мозаики), и вызывать к ней резистентность (Adeel et al., 2021). Между тем отмечено, что хотя НМ и способны ингибировать вирусные патогены, однако механизмы, регулирующие взаимодействие растений, вирусов и НМ, остаются пока неизвестными. Так, в обсуждаемой работе растения табака перед инокуляцией ВТМ, меченным зеленым флуоресцентным белком (GFP-меченый ВТМ), обрабатывали диоксидом титана TiO_2 и серебром Ag (наноразмерные частицы), а также ВДФ C_{60} и углеродными нанотрубками (УНТ) в концентрациях 100, 200 и 500 мг/л (некорневая обработка в течение 21 дня). Растения, обработанные УНТ и ВДФ в концентрации 200 мг/л, продемонстрировали нормальный фенотип, и вирусная симптоматика исчезала через 5 дней после инфицирования. При этом выяснено, что TiO_2 и Ag (автономно) оказались неспособными подавлять вирусную инфекцию. Метод ПЦР показал, что количество транскриптов вирусного белка оболочки и экспрессия мРНК GFP снижаются на 74–81% при обработке растений УНТ и ВДФ. Изображения, полученные на основе просвечивающей электронной микроскопии, показали, что ультраструктура хлоропластов в растениях, обработанных углеродными НМ, осталась незатронутой при инфицировании ВТМ. Отмечается также, что УНТ и C_{60} индуцируют усиление выработки защитных фитогормонов, абсцизовой и салициловой кислот на 33–52%; транскрипция генов, ответственных за их биосин-

тез, повышается при этом в обработанных растениях на 94–104%. Эти результаты убедительно демонстрируют защитную роль НМ на основе углерода с подавлением симптомов инфицирования ВТМ посредством блокирования репликации вируса.

Однако имеются данные о том, что ВДФ C_{60} (с концентрацией 10–500 мг/л; при обработке почвы – с дозой 1000 мг/кг) не оказывает эффекта на прорастание пшеницы мягкой *T. aestivum* L., риса посевного *Oryza sativa* L., огурца посевного *Cucumis sativus* L. и зеленого горошка *Vigna radiata* (L.) Wilczek (Kumar et al., 2015). Отсутствие эффекта авторы объясняют селективной проницаемостью и защитной функцией оболочки семени. По той же причине, как полагают, отсутствует эффект воздействия на прорастание семян арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* L. при обработке 1',1'-дикарбокси-1,2-метанофуллеренами – $C_{70}[C(COOH)_2]_{4-8}$ (Liu et al., 2010).

В ряде других работ сообщается об отсутствии положительных эффектов либо о негативном воздействии, оказываемом фуллереном на рост и развитие растений. Так, обнаружено (Tao et al., 2015), что под влиянием фуллерена C_{60} происходит ингибирование фотосинтетических процессов в фитопланктоне, замедление роста и накопления хлорофиллов в ряске горбатой *Lemna gibba* L. (Santos et al., 2013).

В процессе изучения воздействия фуллерена на наземные растения в качестве почвенной добавки (при повышенной дозе – 500–5000 мг на 1 кг почвы), вводимой для иммобилизации остатков пестицидов, найдено, что происходит уменьшение накопления биомассы, например соевых бобов *Glycine max* (L.) Merr. – на 40%, кукурузы *Z. mays* L. – на 44% и томатов *Solanum lycopersicum* L. – на 10% (De La Torre-Roche et al., 2013); также обнаруживается ингибирование корневого роста у тыквы обыкновенной *Cucurbita pepo* L. (Kelsey, White, 2013).

Исследовано воздействие фуллерена ВДФ C_{60} (в концентрациях 125, 250, 500 и 1000 мг/л) совместно с салициловой кислотой (в концентрации 0.2 мМ) на рост двух генотипов – Pharmasaat и Jelitto – Пижмы девичьей *Tanacetum parthenium* L. в эксперименте, включающем три повторности на точку с рандомизированным дизайном (Ahmadi et al., 2020). Оказалось, что использование салициловой кислоты по-разному влияет на эффекты, оказываемые обработкой фуллереном C_{60} в различных концентрациях в отношении признаков роста обоих генотипов. Так, для генотипа Pharmasaat некорневое внесение салициловой кислоты увеличивает ростовые качества и изменяет фитохимический состав растений, подвергшихся воздействию фуллерена C_{60} во всех перечисленных выше концентрациях, однако оно улучшает рост генотипа Jelitto при более высоких концентрациях фуллерена. Максимальное увеличение,

по сравнению с контролем, сухой массы цветка и листа зарегистрировано для генотипа Jelitto в случае использования фуллерена в концентрации 1000 мг/л в сочетании с салициловой кислотой. В генотипе Pharmasaat содержание сесквитерпенового лактона партенонида значительно возрастает в случае увеличения концентрации фуллерена до 250 мг/л в присутствии салициловой кислоты. Методом сканирующей электронной микроскопии показано, что имеет место усиленное осаждение фуллерена в виде множества сфер различного размера на ткани листьев генотипа Pharmasaat, подвергающегося воздействию высокой концентрации фуллерена, которое приводит к изменениям в клетках эпидермы (трихомах) и разрыву тканей. Примечательно, что при этом не наблюдается значительного увеличения, по сравнению с контролем, содержания эфирного масла.

Закупорка наночастицами пористых структур растений, как сообщают (He et al., 2021), может вызывать фитотоксичность и косвенно влиять на способность растений поглощать питательные вещества и воду. В обсуждаемом исследовании изучалось блокирующее и фитотоксическое действие наночастиц фуллерена nC_{60} на растения на клеточном уровне. Обнаружено, что содержание МДА (малонового диальдегида) как маркера окислительного стресса в растении остается нормальным в присутствии наночастиц nC_{60} , что означает отсутствие эффекта острой фитотоксичности, в то время как нормализованная относительная транспирация значительно уменьшается, показывая, что поры в структуре корней в большей мере закупориваются наночастицами nC_{60} . Методы оптической и просвечивающей электронной микроскопии показали, что эндотелиальные клетки корня сдавлены, а структуры внутренней стенки повреждены в результате экструзии наночастиц. Низкие концентрации наночастиц nC_{60} подавляют поглощение пестицида линдана (гексахлорциклогексана, по-видимому, представляющего собой антиметаболит инозита в растениях) корнями, в то время как их высокие концентрации способствуют поглощению линдана корнями – это указывает на то, что закупоривание пор наночастицами nC_{60} повреждает структуру клеток корней и, следовательно, ускоряет перенос линдана от корней к побегам. Значительные изменения степени насыщения клеточной мембраны корня жирными кислотами показывают, что наночастицы nC_{60} могут приводить к фитотоксичности, обусловленной воздействием на клеточную мембрану корня в результате длительного периода обработки; присутствие этих наночастиц вызывает фитотоксичность из-за блокирования структур пор корня и нарушения текучести клеточной мембраны. Более того, структуры растительных клеток в условиях фитотоксичности с большей вероятно-

стью подвергаются механическому повреждению посредством экструзии наночастиц. Полученные в этом исследовании данные полезны для лучшего понимания путей переноса наночастиц в растениях, фитотоксичности наночастиц и оценки потенциальных рисков НМ, используемых в сельском хозяйстве.

Весьма актуальны и важны исследования, посвященные вопросам аккумуляции и распределения фуллеренов в различных вегетативных органах растений.

Так, сообщается, что фуллерен C_{60} аккумулируется в основном в корневой ткани, однако меньшие его количества детектируются также в листьях и стеблях (Avanasi et al., 2014). В частности, отмечено, что у проростков риса посевного *O. sativa* L., выращиваемых с помощью технологии гидропонники, происходит поглощение фуллерена C_{70} корнями и распределение его в побегах и листьях (Lin et al., 2009).

Зафиксирована аккумуляция фуллерена C_{70} в сосудистых тканях, в окружающих клетках и межклеточном пространстве. Добавление фуллеренов в субстрат вермикулит приводит к поглощению его корневыми системами сои *G. max* (L.) Merr., томатов *S. lycopersicum* L., а также корнями и побегами тыквы *C. pepo* L. (De La Torre-Roche et al., 2012; Avanasi et al., 2014).

В связи с развитием индустрии нанопродуктов необходимо заранее объективно оценивать их влияние на окружающую среду. Так, изучено действие фуллерена C_{60} на биомассу почвенных микроорганизмов и их дыхание. Образцы почвы обрабатывали посредством ВДФ C_{60} (с дозой 10^{-6} г фуллерена на 1 г почвы) или при помощи гранул (с дозой 10^{-3} г фуллерена или фуллерита (фуллерена в конденсированном состоянии) на 1 г почвы). Инкубацию проводили в течение 180 суток. Выяснено, что влияние и ВДФ, и фуллерита на строение и функции почвенных микроорганизмов минимально (Tong et al., 2007).

Исследован (Li et al., 2008) сорбционный процесс, в который фуллерен C_{60} вовлекается в почву. Этот процесс, как оказалось, снижает биодоступность и антибактериальную активность фуллерена, причем сорбция сильно зависит от содержания органического вещества в почве. Отмечается, что возможные взаимодействия между гуминовыми веществами и фуллереном способствуют устранению токсичности последнего. Сделан вывод о том, что природное органическое вещество в окружающей среде может существенно смягчить потенциальное действие фуллерена на микробиологическую активность, выполняя тем самым протекторную функцию для экосистем.

Активность нанокремниевых материалов, поглощенных растением, зависит и от взаимодей-

ствия их с органическими соединениями в гетерогенной клеточной среде. Установлено, что природные органические соединения, связываясь с фуллереном C_{70} , повышают его гидрофильность (Kokubo et al., 2008). Причем, как известно, в отношении биологических эффектов наночастиц часто не наблюдается классической зависимости доза–эффект вследствие способности этих частиц формировать агрегаты в гетерогенной среде, которой является содержимое клетки (Li et al., 2008).

В ряде публикаций сообщается, что фуллерены потенциально могут способствовать накоплению загрязнений органических веществ в растениях. Так, зарегистрировано увеличение на 80% накопления промышленного растворителя трихлорэтилена тополем дельтовидным *Populus deltoides* L., который культивировали на гидропонике с ВДФ C_{60} в концентрации 15 мг/л (Ma, Wang, 2010). Как предполагают, комплекс фуллерена с трихлорэтиленом, образующийся в питательном растворе, поглощается растениями.

В исследовании (De La Torre-Roche et al., 2012), выполненном на вермикулитовом субстрате, показано, что фуллерен C_{60} (при дозе 40 мг на один вегетационный сосуд) способствует увеличению содержания 2,2-дихлор-1,1-бис(4-хлорфенил)этилена (ДДЭ), представляющего собой метаболит инсектицида 2,2,2-трихлор-1,1-бис(4-хлорфенил)этана (ДДТ), в тыкве обыкновенной *C. pepo* L., в сое *G. max* (L.) Merr. и томатах *S. lycopersicum* L. приблизительно на 30, 45 и 62% соответственно. Важно отметить, что фуллерен при этом детектируется (совместно с загрязнителем ДДЭ) в основном в корневой ткани и на поверхности корней, причем анализ растительной ткани не обнаруживает каких-либо повреждений клеточных мембран.

ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОЛИГИДРОКСИЛИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА

К числу обладающих выраженными свойствами биологической активности водорастворимых производных фуллерена относятся фуллеренолы, в частности [60]фуллеренолы – полигидроксильрованные производные фуллерена C_{60} (ПГФ), $C_{60}(OH)_n$, – имеющие простую структуру и возможности для дальнейшей функционализации (Li et al., 1993; Chiang et al., 1994, 1996; Semenov et al., 2011). Долгое время именно фуллеренолы рассматривались как наиболее перспективные водорастворимые производные фуллерена для исследования свойств биологической активности. Следует отметить, что смеси фуллеренолов в зависимости от метода получения имеют различный состав, отличающийся числом гидроксильных групп ($n = 12–24$), и, как следствие, различную растворимость в воде (Chiang et al., 1994).

Обнаружено, что фуллеренолы способны оказывать частично положительный эффект на рост и стимуляцию клеточного деления, например, культуры зеленых водорослей *Pseudokirchneriella subcapitata*, а также на рост гипокотыли арабидопсиса *A. thaliana* L. (Gao et al., 2011).

Сообщалось, однако, что в присутствии ПГФ наблюдалось повреждение клеток лука репчатого *Allium cepa* L. (Chen et al., 2010).

В другом исследовании найдено, что обработка семян горькой дыни *Momordica charantia* L. раствором ПГФ приводит к увеличению биомассы растений на 54%, урожая – на 128%, а содержания полезных веществ – на 90% (Kole et al., 2013). Как предполагают, положительный эффект при воздействии этих производных на растения сопряжен с антиоксидантной активностью ПГФ, а именно с их способностью связывать АФК (Gharbi et al., 2005; Yin et al., 2009). В частности, обнаружено свойство [60]фуллеренола предотвращать развитие окислительного стресса в корнях и субапикальное утолщение корней при УФ-облучении проростков зерновых культур благодаря снижению содержания АФК.

По результатам обработки семян ярового ячменя *Hordeum vulgare* L. растворами различных концентраций обнаружена высокая биологическая активность [60]фуллеренола (Панова и др., 2013; Panova et al., 2016). Полученные результаты продемонстрировали перспективность использования ПГФ для улучшения продукционного процесса. Однако следует отметить важность изучения всей потенциальной цепочки загрязнений, так как остаточные количества фуллеренола детектируются в различных органах растения, в том числе и плодах.

Детальный механизм взаимосвязи между ростом растения и промогированием ростового усиления при воздействии фуллеренола пока еще остается не вполне ясным. Но возможно, что, по крайней мере, частично его можно объяснить антиоксидантными свойствами, связанными со способностью фуллеренола осуществлять захват радикалов (Beuerle et al., 2008).

Обнаружено (Shafiq et al., 2021), что фуллеренол способен регулировать окислительный стресс и ионный гомеостаз в тканях яровой пшеницы *T. aestivum* L., повышая нетто-продуктивность в условиях солевого стресса. Так, влияние нанопрimesи фуллеренола (в концентрациях 10, 40, 80 и 120 нМ) на пшеницу, подвергнутую воздействию соли (NaCl, 150 мМ), исследовали в естественных условиях. Засоление приводит к различным изменениям процесса роста пшеницы, уменьшению биомассы побегов и корней, нарушению поглощения ионов и снижению содержания хлорофилла. Несмотря на увеличение активности ферментов у растений пшеницы, подвергшихся солевому стрессу, наблюдается усиленное образование АФК (содержание аниона O_2^- повышено на 48.1%; содержа-

ние H_2O_2 – на 62.2%), а также ПОЛ (содержание МДА повышено на 40.8%). Возможно, что усиление активности ферментов все же оказывается не способным обеспечить полную нейтрализацию окислительного стресса, вызванного засолением. Между тем [60]фуллеренол (в наномолярных концентрациях) способствует усилению метаболизма АФК и снижению показателей окислительного стресса. При этом нормализация (на фоне избыточного содержания ионов Na^+) относительных концентраций ионов K^+ , Ca^{2+} , фосфат-ионов, а также растворимых сахаров и аминокислот стабилизирует в проростках осмотический баланс. Такие биохимические модификации способствуют улучшению, по сравнению с контролем, показателей урожайности (вплоть до 18.5% на 100 зерен) у растений, подвергшихся воздействию засоления. Более того, у собранных семян с растений, обработанных фуллеренолом, наблюдается улучшение показателей всхожести и роста семян. Авторы обсуждаемого исследования (Shafiq et al., 2021) делают вывод о нетоксичном, стимулирующем рост воздействии наночастиц фуллеренола на урожай пшеницы, а также отмечают возможность и перспективы его экзогенного применения для восстановления урожайности сельскохозяйственных культур в условиях засоления.

На культуре ячменя *H. vulgare* L. изучалось (Молчан и др., 2014) влияние, оказываемое в широком диапазоне концентраций (10^{-5} – 10^{-2} %) ПГФ, в частности фуллеренола $C_{60}(OH)_{24-26}$, на прорастание семян и содержание фенольных соединений, причем исследована и антирадикальная активность этих производных. Установлено, что в присутствии указанных ПГФ количество проросших семян в первые сутки на 10–20% выше, по сравнению с контролем, при этом увеличение концентрации ПГФ приводит к дополнительной стимуляции прорастания. Максимальное количество (около 60%) проросших семян зафиксировано в образцах, обработанных растворами с высокими (5×10^{-3} – 10^{-2} %) концентрациями ПГФ. В процессе прорастания в семя сначала поступает вода, а затем активируются различные физиолого-биохимические процессы. Стимулирующее влияние фуллеренола на прорастание семян в первые сутки, по-видимому, обусловлено как интенсификацией поглощения воды и набухания, так и активацией процессов метаболизма. При этом ПГФ, представляя собой водорастворимое производное, может поступать в семена уже на первых этапах набухания с током воды. Возможно, что молекулы ПГФ способны инициировать образование пор в оболочке семени, ускоряя, таким образом, поступление воды. Подобный эффект установлен при исследовании влияния УНТ на прорастание семян томата *S. lycopersicum* L. (Khodakovskaya et al., 2013).

В работе (Зайцев и др., 2011) при оценке энергии прорастания и всхожести учитывались только “нормально проросшие семена”, имеющие не менее двух развитых корешков размером более длины семени и побег размером не менее половины семени (в соответствии с ГОСТом 12038-84).

Отмечено, что в присутствии наночастиц [60]фуллеренола показатели энергии прорастания на 10–20% выше, по сравнению с контролем. Вместе с тем обращает на себя внимание усиление эффекта низких концентраций (10^{-5} и $10^{-4}\%$) и снижение эффективности действия высоких концентраций (5×10^{-3} – $10^{-2}\%$) фуллеренола в процессе дальнейшего прорастания семян, по сравнению с влиянием, обнаруженным в первые сутки (Молчан и др., 2014). Возможно, что накопление в прорастающих семенах большого количества наночастиц препарата (при воздействии фуллеренола в высоких концентрациях) приводит к некоторому торможению ростовых процессов. Менее проявленный эффект высоких концентраций фуллеренола (например, при концентрации $10^{-2}\%$), возможно, также связан с формированием его агрегатов. Так, известно, что фуллеренол при растворении в воде в концентрации 10^{-3} – 5×10^{-3} М формирует полианионные наноагрегаты размером 20–100 нм, способные аккумулироваться в клетках и тканях, что препятствует току питательных и регуляторных элементов, приводя к задержке ростовых процессов (Vileno et al., 2006; Brant et al., 2007).

При оценке всхожести семян ячменя *H. vulgare* L. на седьмые сутки прорастания выявлено, что количество нормально проросших семян при воздействии [60]фуллеренола в концентрациях 10^{-5} – $10^{-2}\%$ практически равно контрольному (Молчан и др., 2014). Незначительный стимулирующий эффект зафиксирован при воздействии фуллеренола в концентрации $10^{-3}\%$. Несколько ниже оказались средние значения показателей всхожести семян, прораставших в присутствии 5×10^{-3} – $10^{-2}\%$ фуллеренола, однако не наблюдалось достоверного отличия от контрольных значений. Таким образом, и в контрольном варианте, и в присутствии фуллеренола всхожесть семян составила в среднем около 90%. В обсуждаемой работе, кроме того, осуществлена оценка воздействия фуллеренола на физиологическое состояние проростков. Поскольку под воздействием фуллеренола наблюдается увеличение скорости прорастания, то вполне закономерным является факт прироста биомассы надземной части проростков в присутствии наночастиц фуллеренола, по сравнению с контролем. Так, в среднем сырая масса надземной части десяти трехдневных проростков в присутствии фуллеренола оказалась на 10–20% больше, по сравнению с контролем. Примечательно, что максимальный прирост массы зафик-

сирован под влиянием минимальных концентраций (10^{-5} и $10^{-4}\%$) фуллеренола в растворе.

Среди метаболических процессов важнейшими являются процесс дыхания и сопутствующие ему окислительно-восстановительные реакции (Обручева, Антипова, 1997). При этом неотъемлемыми составляющими стимуляции метаболизма при выходе из состояния покоя будут повышение концентрации АФК и активация антиоксидантной системы в клетках прорастающих семян (Noctor et al., 2007).

Фенольные соединения представляют собой мощные антиоксиданты. В этой связи влияние ПГФ на сумму фенольных соединений в проростках выступает весомым воздействующим фактором. Интерес к исследованию содержания фенольных соединений стимулируется тем, что эти соединения являются структурными компонентами, принимающими участие в образовании клеток и тканей, запасных дыхательных субстратов, а также индукторами различных сигналов при взаимодействии растения с окружающей средой (Запрометов, 1993).

В экспериментах, касающихся влияния ПГФ на содержание фенольных соединений в проростках ячменя *H. vulgare* L., установлено, что в тканях надземной части трехдневных проростков, культивирующихся в присутствии [60]фуллеренола с повышенными концентрациями ($5 \times 10^{-3}\%$) в растворе, содержание фенольных соединений снижается от 0.77 мг/г сухой массы в контроле до 0.62 мг/г сухой массы (Молчан и др., 2014). Как предполагается, уменьшение содержания суммы фенольных соединений в тканях проростков ячменя под воздействием фуллеренола в этом случае обусловлено его собственной антиоксидантной активностью. Также найдено, что под влиянием фуллеренола при повышении его концентрации в растворе (в диапазоне от 10^{-5} до $5 \times 10^{-3}\%$) антирадикальная активность снижается в среднем на 10% – от 43.70% в контроле до 34.93% при концентрации фуллеренола $5 \times 10^{-3}\%$. При этом значения величин суммы фенольных соединений и их антирадикальной активности в проростках ячменя в присутствии фуллеренола с высокой концентрацией в растворе ($10^{-2}\%$) достигают контрольных значений, составляя 0.75 мг/г сухой массы и 34.93% соответственно (Молчан и др., 2014). Выдвинуто предположение о том, что фуллеренол с высокой концентрацией в растворе ($10^{-2}\%$) стимулирует в проростках развитие стрессовой реакции, приводящей к активации антиоксидантной системы, в частности происходит усиление биосинтеза фенольных соединений, обладающих антирадикальной активностью.

Показано (Якушев и др., 2010), что добавление раствора ПГФ в корнеобитаемую среду приводит к ускорению роста корней проростков ячменя

H. vulgare L. Влияние ПГФ на корневой рост оказалось более выраженным в условиях наличия стрессорного фактора УФ-излучения, которое индуцирует генерацию АФК. Методом флуоресценции (в присутствии индикатора диацетилированного 2',7'-дихлорфлуоресцеина) *in vivo* установлено, что ПГФ предотвращает развитие окислительного стресса. Однако отмечено, что при воздействии на проростки ячменя раствора ПГФ с высокой концентрацией ($>10^{-3}$ М) наблюдается замедление корневого роста, по сравнению с контролем, тогда как при низких концентрациях (10^{-5} – 10^{-4} М) растворов ПГФ таковой оказывается выше, чем в контроле. Указанный эффект связывают с тем, что сам по себе ПГФ в высоких концентрациях проявляет повышенную прооксидантную активность (Zha et al., 2012), и, более того, как упомянуто выше, происходит формирование наноагрегатов, которые, аккумулируясь в клетках и тканях, препятствуют току питательных и регуляторных элементов, приводя к задержке ростовых процессов (Vileno et al., 2006; Brant et al., 2007).

При сравнительном анализе литературных данных (Панова и др., 2015) рассмотрена возможность управления продукционным процессом растений с помощью различного типа биологически активных препаратов, содержащих в различной форме необходимые для растений макро- и микроэлементы. Обоснована возможность использования НМ, в частности водорастворимых производных фуллерена C_{60} , в качестве новых форм для создания препаратов (с регуляторными, адаптогенными и протекторными функциями), предназначенных для обработки семенного материала и вегетирующих растений. На примере наносоставов, созданных на основе водорастворимых ПГФ, показана их способность усиливать транспорт основных макроэлементов в растениях, интенсифицировать рост растений и процессы трансформации органических и минеральных соединений в корнеобитаемой среде, повышать продуктивность растений и их устойчивость к действию окислительного стресса, улучшать качество растительной продукции.

Уникальные свойства НМ на основе углерода, включая фуллерен, вызывают большой интерес для применения в сельском хозяйстве и в областях, связанных с охраной окружающей среды. Так, найдено (Bityutskii et al., 2021a), что водорастворимое ПГФ – фуллерен $C_{60}(OH)_{22-24}$ – по-разному изменяет реакцию метаболитов в зависимости от уровня железа в растениях огурца посевного *C. sativus* L. Железо – важный питательный микроэлемент, участвующий в основных метаболических процессах, недостаток которого вызывает хлороз и снижает урожайность многих культур, выращиваемых во всем мире. В обсуждаемой работе исследованы метаболические реакции огурца по-

севного на обработку фуллереном в зависимости от содержания железа в растениях. Растения огурца посевного выращивали на гидропонике с подачей питательного раствора фуллеренола либо в присутствии ионов железа Fe(II) и Fe(III), либо при их отсутствии. В зависимости от степени окисления железа зафиксированы эффекты, связанные с изменением метаболизма углеводов, аминокислот, органических кислот и липофильных соединений. Наблюдаемые метаболические нарушения, вызываемые фуллереном в растениях, обработанных Fe(III), имеют противоположный тип, нежели у растений, получивших Fe(II). В то время как в растениях, получивших Fe(III), фуллерен активизирует метаболизм углеводов и аминокислот, в растениях, получивших Fe(II), фуллерен активизирует метаболизм липофильных соединений, подавляя метаболизм углеводов и аминокислот. У растений с дефицитом Fe(III) фуллерен стимулирует метаболизм С3-карбоксилатов и липофильных соединений, подавляя метаболизм аминокислот, гексоз и дикарбоксилатов, а у растений с дефицитом Fe(II), наблюдается активация метаболизма аминокислот и дикарбоксилатов, а также подавление фуллереном метаболизма стероидов. Результаты обсуждаемого исследования показали, что валентное состояние железа имеет существенное значение (в частности, как это видно на примере с растениями огурца посевного) для перепрограммирования метаболических реакций на фуллерен и в условиях достаточного количества железа, и в условиях его дефицита. Такие исследования представляют интерес и важны для понимания взаимодействия фуллеренов и для оценки рисков при культивировании растений с различными статусами железа. Отмечается также, что оптимальной для повышения посредством фуллеренола $C_{60}(OH)_{22-24}$ эффективности некорневой подкормки железом у огурцов *C. sativus* L. с дефицитом железа оказалась комбинация сульфата Fe(II) с фуллереном (Bityutskii et al., 2020). Так, добавление фуллеренола к растворам сульфата Fe(II) значительно увеличивает и активность железа в листьях, и повторное озеленение в месте нанесения препарата. Однако в отсутствие железа влияния фуллеренола не наблюдается, что указывает на благоприятную роль совместного воздействия Fe(II) и фуллеренола для проникновения Fe(II) в листья и для повторного озеленения в условиях ограниченного содержания железа. Полученные результаты имеют существенную ценность для увеличения потенциала некорневой подкормки с добавлением железа как общепринятой стратегии устранения его дефицита и повышения урожайности, а также для повышения качества сельскохозяйственных культур.

В другом исследовании (Bityutskii et al., 2021b), кроме того, обнаружено, что фуллерен обладает способностью защитить растения огурца по-

севного *C. sativus* L. от дефицита железа за счет увеличения утилизации апопластического железа в корнях. В исследовании (Bityutskii et al., 2022) выявлено, что водорастворимый фуллеренол $C_{60}(OH)_{22-24}$ оказывает влияние на растения кукурузы *Z. mays* L. в зависимости от содержания железа. В эксперименте растения выращивали на гидропонике. Показано, что позитивное воздействие фуллеренола наблюдается на растениях, лишенных Fe(II), и включает успешное подавление хлороза с дефицитом железа в растениях, главным образом, в более молодой (базальной и средней) области листовой пластинки. В этой области наблюдается более выраженный хлороз, по сравнению с более старой (апикальной) областью листовой пластинки. Эти изменения сопровождаются значительным увеличением активного железа в листьях и снижением апопластического железа в корнях, что позволяет предположить, что фуллеренол способен усиливать мобилизацию железа в корнях, помогая облегчить хлороз с дефицитом железа. Напротив, не наблюдается никаких заметных эффектов у растений, лишенных Fe(III), поскольку содержание железа в корнях при этом значительно ниже, чем у растений с дефицитом Fe(II). Кроме того, отмечено, что фуллеренол не оказывает влияния на растения, богатые железом, вне зависимости от степени окисления железа, присутствующего в составе хелата, используемого в роли источника этого элемента, — Fe(II)—ЭДТА или Fe(III)—ЭДТА (ЭДТА — этилендиаминотетрауксусная кислота). Полученные в этом исследовании результаты предоставили новые доказательства благотворной роли взаимодействия железа и фуллеренола в повышении устойчивости злаковых растений к условиям дефицита железа, что является одним из основных проблемных и ограничивающих факторов при производстве сельскохозяйственных культур во всем мире.

ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ ДИКАРБОКСИМЕТАНОФУЛЛЕРЕНОВ (МАЛОНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНОВ)

Среди производных фуллеренов C_{60} и C_{70} , проявляющих достаточную для проведения достоверного исследования водорастворимость, важную роль в биологических исследованиях играют аддукты, представленные 1',1'-дикарбокси-1,2-метанофуллеренами (так называемыми малоновыми производными фуллеренов) и их аналогами, образующимися в результате олигоприсоединения (Lamparth, Hirsch, 1994; Hirsch, 2013). В частности, хорошей водорастворимостью обладают *трис-* и *гексакис-*малоновые производные фуллеренов C_{60} и C_{70} — $C_{60}[C(COOH)_2]_n$ и $C_{70}[C(COOH)_2]_n$ ($n = 3, 6$).

В исследовании (Panova et al., 2021) изучено влияние водорастворимого *трис-*дикарбоксиметанофуллеренового (малонового) аддукта $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ на физиологическое состояние, рост и нетто-продуктивность салата-латука *Lactuca sativa* L., томатов *S. lycopersicum* L., ярового ячменя *H. vulgare* L. и пшеницы *T. aestivum* L. на начальных стадиях прорастания семян и в вегетационный период развития растений по изменению увеличения поглощающей и ассимиляционной способностей корней и надземных частей растений. Изучено также распределение указанного фуллеренового аддукта в органах, содержащих физиологически активные органические соединения, потенциально участвующие в циклических процессах катаболизма растений и влияющие на оптимизацию функции антиоксидантной системы. В данном исследовании комплекс оцененных показателей реакции семян и состояния проростков показал положительное влияние растворов фуллеренового аддукта $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ в диапазоне концентраций 10^{-3} – 10^{-1} мг/л на подопытные растения.

Однако обнаружено, что не во всех случаях функционализированные фуллерены способны проявлять эффект стимуляции в отношении роста растений. Так, сообщается (Liu et al., 2010), что добавление водорастворимых фуллереновых аддуктов $C_{70}[C(COOH)_2]_{4-8}$ в питательную среду дозозависимым образом усиливает ингибирование роста корней (вплоть до 60%) и приводит к деформации кончика корней у арабидопсиса *A. thaliana* L. Выдвинуто предположение о том, что указанные негативные эффекты могут быть связаны с нарушением транспорта ауксина в корнях, отклонениями в процессах клеточного деления в зоне меристемы корня и с уменьшением внутриклеточного количества АФК.

На клеточной культуре табака сигарного *Nicotiana tabacum* L. в присутствии фуллереновых аддуктов $C_{70}[C(COOH)_2]_{2-4}$ зафиксированы эффекты ингибирования роста, связанные с деформацией клеточной стенки и окислительным стрессом (Liu et al., 2013). Сделан вывод о том, что адсорбция таких аддуктов фуллерена C_{70} на клеточных стенках приводит к разрушению клеточных стенок и мембран, что в итоге ингибирует рост клеток. При воздействии обсуждаемого аддукта фуллерена C_{70} наблюдается увеличение количества гликозидных остатков на клеточных стенках (в зависимости от концентрации растворов и времени воздействия), а также аккумуляция АФК, что, по-видимому, представляет собой стратегию защиты растения при воздействии производных фуллерена.

Имеются также сведения о том, что, например, водорастворимые фуллереновые аддукты $C_{70}[C(COOH)_2]_{4-8}$ при воздействии на трансгенные растения арабидопсиса *Arabidopsis* вызывают замедление корневого роста проростков, потерю

у них гравитропизма. Методом флуоресцентного анализа (в присутствии индикатора диацетилованного 2',7'-дихлорфлуоресцеина) *in vivo* выявлены тенденции к аномалиям корневого развития, гормонального обмена, клеточного деления и нарушения в строении микротрубочек. Предполагают, что эти негативные эффекты опосредованы понижением содержания АФК и уменьшением митохондриальной активности в клетках корневой (Liu et al., 2010).

Поглощение, транслокация и аккумуляция производных фуллеренов C_{60} и C_{70} в растениях описаны также на примерах редиса *Raphanus sativus* L., лука репчатого *A. cepa* L., дыни горькой *M. charantia* L., пшеницы *T. aestivum* L. (Lin et al., 2009; Chen et al., 2010; Kole et al., 2013; Avanasi et al., 2014; Wang et al., 2016).

На примерах проростков пшеницы *T. aestivum* L. и редиса *R. sativus* L. показано, что поглощение растениями производных фуллеренов C_{60} и C_{70} зависит от их концентрации в корнеобитаемой среде, и эти соединения аккумулируются преимущественно в корнях (Lin et al., 2009; Avanasi et al., 2014).

ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ И ПЕПТИДНЫХ ФУЛЛЕРЕНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

Впервые о присоединении аминокислот (или пептидов) к фуллерену C_{60} с образованием соответствующих моноаддуктов было сообщено в работе (Романова и др., 1994). Первоначально состав получаемых аддуктов фуллерена C_{60} – аминокислотных производных фуллерена (АКПФ) – подтверждали методами аминокислотного анализа, проводимого после деструкции синтезированных соединений. В дальнейшем найден эффективный воспроизводимый аналитический метод доказательства строения аминокислотных моноаддуктов фуллерена C_{60} с использованием твердотельной спектроскопии ЯМР (Ямскова и др., 2019б).

Также показано, что на основе фуллерена C_{60} и аминокислот возможно получение и полиаддуктов фуллерена (Думпис и др., 2014).

В процессе испытаний на важных сельскохозяйственных зерновых культурах обнаружено, что повышение нетто-продуктивности растений и их устойчивости к окислительному стрессу после введения (в корнеобитаемую среду или при некорневой обработке растений) и ПГФ ($C_{60}(\text{OH})_{20-24}$), и АКПФ C_{60} ($\text{H}_2\text{-C}_{60}\text{-}[(\epsilon\text{-N})\text{L-Lys-OH}]_2$, $\text{H}_2\text{-C}_{60}\text{-}[\text{L-Thr-OH}]_2$, $\text{H}_2\text{-C}_{60}\text{-}[\text{L-Arg-OH}]_2$, $\text{H}_2\text{-C}_{60}\text{-}[\text{L-(}\gamma\text{-OH)Pro-OH}]_2$) связано с изменениями в структуре и с эффективностью фотосинтетического аппарата. Указанные эффекты также опосредованы влиянием фуллереновых производных на систему антиоксидантной защиты, а именно: влиянием на интенсивность ПОЛ, генерацию АФК и ферментативную активность СОД (Панова и др.,

2018). Так, влияние упомянутых производных фуллерена C_{60} на растения яровой пшеницы мягкой *T. aestivum* L. и ярового ячменя *H. vulgare* L. изучены в серии вегетационных опытов в регулируемых благоприятных условиях и при моделировании окислительного стресса (в условиях УФ-облучения надземной части растений). Воздействие на растения производными фуллерена осуществляли посредством введения в корнеобитаемую среду аэрируемого раствора с концентрацией 1 мг/л или при некорневой обработке – с концентрациями 0.1 и 15 мг/л. В качестве контрольных использованы растворы макро- и микроэлементов без производных фуллерена (Панова и др., 2018; Panova et al., 2016). Для оценки антиоксидантных свойств фуллереновых производных определяли: интенсивность ПОЛ – по накоплению МДА; ферментативную активность СОД – методом, основанным на ее способности конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные радикалы; генерацию АФК – по превращению адреналина в адренохром (со спектрофотометрическим контролем при $\lambda = 480$ нм) (Лукаткин, 2002; Панова и др., 2018; Purvis et al., 1995).

В серии экспериментов на зерновых культурах (Панова и др., 2018) выбор АКПФ обусловлен тем, что, например, L-лизин, L-треонин и L-аргинин относят к незаменимым аминокислотам, которые не синтезируются в организме человека и животных, а L- γ -гидроксипролин интересен с точки зрения неспецифического повышения устойчивости растений к стрессовым воздействиям. Результаты оценки влияния АКПФ на растения яровой пшеницы *T. aestivum* L. и ячменя *H. vulgare* L. свидетельствуют о том, что присутствие этих соединений в корнеобитаемой среде способствует формированию листьев большей площади, для которых характерно и более высокое содержание хлорофиллов. Полученные данные показывают, что под влиянием фуллереновых производных формируется фотосинтетический аппарат, обладающий функциональным потенциалом, превышающим таковой у растений в контроле, что в итоге приводит к росту нетто-продуктивности. Также обнаружено, что внесение фуллереновых производных в корнеобитаемую среду способствует уменьшению содержания антоцианов в листьях пшеницы и ячменя. Эти факты являются косвенным свидетельством улучшения физиологического состояния растений, что подтверждается более высокими показателями их роста.

Исследование биоактивности наноконпозиций на основе АКПФ $\text{H-C}_{60}\text{-L-Thr-OH}$ для потенциального применения в сельском хозяйстве (Panova et al., 2019) показали, что они способствуют неспецифической устойчивости растений к действию стрессовых факторов: УФ-излучения, пестицидов и фитопатогенов. Кроме того, в обсуждаемой работе определены перспективы использования аддукта $\text{H-C}_{60}\text{-L-Thr-OH}$ при выращивании растений в условиях снижения пестицидной нагрузки на окру-

жающую среду. Изучение свойств биологической активности АКПФ Н-С₆₀-L-Thr-ОН выявило его способность стимулировать рост растений благодаря оказываемому влиянию на активность фотосинтетического аппарата и его антиоксидантным свойствам.

Важно отметить, что, по имеющимся в литературе данным, индукция синтеза антоцианов представляет собой неспецифический ответ на действие различных абиотических стрессоров – на УФ-излучение, аридные условия или дефицит азота (Якушев и др., 2010; Kanash et al., 2013).

Под влиянием фуллереновых производных, удлиняются корни, увеличивается высота растений, число стеблей, и в итоге возрастает биомасса растений и их вегетативных органов. Так, у зерновых культур озимой пшеницы *T. aestivum* L. и ярового ячменя *H. vulgare* L. при введении фуллереновых производных в корнеобитаемую среду общая сухая масса (корни, стебли, листья) превышает соответствующие показатели в контроле в 1.3–3.3 раза. При этом в эксперименте с некорневой обработкой растений растворами фуллереновых производных сухая масса надземной части растений достоверно не отличается от таковой в контроле, тогда как масса корней повышается на 8–40% (Панова и др., 2018). Примечательно, что растворы, содержащие аминокислотные аддукты фуллерена С₆₀, в большинстве случаев оказывают существенно более значимое положительное действие, чем такие же растворы, но содержащие только аминокислоту, аналогичную входящей в состав АКПФ.

Установлено также, что АКПФ оказывают значительное влияние на антиоксидантную систему растений пшеницы и ячменя. В частности, произведено сравнение двух АКПФ: I (треонинового) – Н₂-С₆₀-[L-Thr-ОН]₂ и II (гидроксипролинового) – Н₂-С₆₀-[L-(γ-ОН)Pro-ОН]₂. Так, в листьях и корнях интенсивность ПОЛ снижается под воздействием АКПФ I и II на 10–30%. При этом ферментативная активность СОД у обеих культур под воздействием АКПФ имеет тенденцию как к повышению, так и к снижению (в зависимости от вегетативных частей растения). Но наибольший контраст при сравнении двух культур имеет место в изменении содержания АФК в листьях и корнях под воздействием вышеупомянутых АКПФ I и II: наблюдается как соответствующее возрастание показателя у ячменя – в корнях (на 91 и 212%), листьях (на 16 и 87%), а у пшеницы – в корнях (на 56%, с АКПФ II), так и его снижение (с АКПФ I) у пшеницы – в корнях (на 61%) и листьях (на 71%); кроме того, прослеживается тенденция к его снижению (с АКПФ II) в листьях пшеницы. Антиоксидантный эффект некорневой обработки растворами АКПФ I и II наиболее выражен в листьях растений. В корнях, наоборот, проявляются признаки усиления окислительных процессов, особенно у ячменя (Панова и др., 2018). Неоднозначность результатов объяснима неодинаковой чувствительностью пшеницы и ячменя (в зависимости от сорта) к раз-

ного рода воздействиям. Так, увеличение содержания АФК в корнях и листьях у более отзывчивого на изучаемые вещества ячменя при их поступлении через корнеобитаемую среду или в корнях при некорневой обработке косвенно свидетельствуют о вероятном участии АФК в конструктивном метаболизме растений, а также, по-видимому, об иммуномодулирующей роли АКПФ I и II. Эффект АКПФ можно сравнить с действием вакцины, активирующей иммунный ответ на потенциально опасный фактор до его воздействия, что существенно повышает устойчивость растений. У менее реактивной, в сравнении с ячменем, пшеницы более выражен прямой антиоксидантный ответ на воздействие АКПФ как при обработке через корнеобитаемую среду, так и при некорневой обработке. Важно также отметить, что стрессоустойчивость растений ячменя, обработанных АКПФ I и II, при действии УФ-излучения, судя по массе надземной части и корней, оказалась на 10–20% выше, чем у контрольных облученных растений.

Отмечено, что полученные результаты свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения механизмов влияния водорастворимых производных фуллеренов на растения и среду их обитания с целью создания высокоэффективных препаратов для растениеводства, у которых высокая эффективность в малых концентрациях и экологическая безопасность сочетаются с низкими затратами на применение благодаря твердой порошкообразной форме (в отличие от жидких аналогов) (Панова и др., 2018).

Сообщается (Lang et al., 2019), что водорастворимое АКПФ (с 12 остатками глицина) стимулирует накопление хлорофилла в зеленых микродорослях *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. (Volvocales, Chlorophyceae), служащих подходящей моделью в научных исследованиях и перспективной промышленной биотехнологической платформой для производства биотоплива и рекомбинантных белков. Указанное выше глицинсодержащее производное АКПФ протестировано в отношении острой токсичности (при концентрации до 50 мкг/мл) и в качестве потенциального биостимулятора роста водорослей. Систематически исследовано влияние АКПФ на пигментный состав и скорость роста *Chlamydomonas reinhardtii*. Полученные результаты показали, что протестированное АКПФ не обнаруживает токсического действия, а также не оказывает влияния на размер и скорость роста клеток, не приводит к негативным изменениям содержания пигмента; при его воздействии не наблюдается проявления симптомов стресса и изменений в параметрах фотосинтеза. В частности, отмечено, что при концентрации 20 мкг/мл такое глицинсодержащее АКПФ стимулирует накопление хлорофилла в трехдневных культурах.

Сообщается об исследовании новых стимуляторов роста растений, полученных на основе водорастворимых наночастиц N-замещенных мо-

ноаминокислотных производных фуллерена C_{60} и об изучении механизмов их действия (Волков и др., 2020). Изучены ростостимулирующие эффекты водорастворимых наночастиц АКПФ – производных фуллерена C_{60} с аминокислотами: *L*- и *D*-аланинами, *L*- и *D*-валинами, *L*- и *D*-аспарагиновыми кислотами, β -аланином, а также с γ -аминомасляной и ϵ -аминокапроновой кислотами (в форме калиевых солей). Так, на примере гороха посевного *Pisum sativum* L. обнаружено, что размер наночастиц и относительная антирадикальная активность АКПФ представляют собой мощные факторы, оказывающие влияние на физиологические параметры: скорость прорастания семян, энергию прорастания и способность к росту корней. Показано, что относительная антирадикальная активность наночастиц в выбранной группе соединений определяется общей площадью поверхности наночастиц независимо от структуры аминокислотного заместителя. Убедительно продемонстрированы возможность использования упомянутых АКПФ в роли эффективных соединений, стимулирующих вегетацию и, в частности, дозависимое влияние, оказываемое калиевой солью *N*-(моногоидрофуллеренил)-*D*-аланина – $N-C_{60}-D-Ala-OH$ – в диапазоне низких концентраций (10^{-9} – 10^{-11} М) на скорость и энергию прорастания семян полевого гороха.

ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОЧИХ ФУЛЛЕРЕНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

Получены (Liu et al., 2019) четвертичные аммониевые соли иминофуллеренов и изучено их влияние на прорастание семян. В обсуждаемом исследовании водорастворимые четвертичные аммониевые соли иминофуллеренов – IFQA (quaternary ammonium salts of iminofullerenes) синтезированы методом нитреновой химии в сочетании с кватернизацией. Полученные соединения посредством различных спектроскопических методов идентифицированы как фуллереновые производные, имеющие следующий состав: $[C_{60}(NCH_2CH_2NH_3^+CF_3COO^-)_4 \cdot 10H_2O]_n$. Для тестирования свойств биологической активности IFQA, заключающейся во влиянии на прорастание семян, использован семенной материал кукурузы *Z. mays* L. и арабидопсиса *A. thaliana* L. Найдено, что, в сравнении с контролем, воздействие IFQA (на второй день) на семена кукурузы (в концентрации 50 мг/л) имеет следующие показатели: норма – 73.1 против 58.7%; засуха – 66.7 против 50.0%, тогда как его воздействие на семена арабидопсиса (в концентрации 20 мг/л) имеет следующие показатели: норма – 77.5 против 58.8%; засуха – 63.3 против 36.7%. Из приведенных данных видно, что у арабидопсиса наблюдаются сравнительно более высокие показатели всхожести и скорости прорастания. Результаты двумерного гель-электрофореза в сочетании с масс-спектроскопией показали, что содержание двадцати видов белка в про-

теоме зародышей семян кукурузы в результате воздействия IFQA претерпевает значительное (более чем на 50%) изменение. Кроме того, пониженная регуляция шести белков-накопителей и повышенная регуляция четырех белков, индуцированных IFQA для производства энергии и метаболизма сахара, указывают на ускоренную метаболическую активность прорастания семян кукурузы. Повышенная регуляция восьми связанных со стрессом белков и антиоксидантных ферментов позволила предположить, что роль IFQA заключается в активации метаболических процессов при прорастании семян, а также проявляется в усилении реакции семян на стресс. Полученные результаты представляют важные сведения для понимания механизма повышения всхожести семян с использованием углеродных НМ.

Проведены испытания по изучению влияния, оказываемого регулятором роста, представляющим собой совокупность аддуктов, полученных из смеси фуллеренов фракции C_{50} – C_{92} и 3-индолилуксусной, а также 3-индолилмасляной кислот, на морфофизиологические свойства яровой пшеницы *T. aestivum* L. твердого сорта в процессе прорастания семян. Тестирование осуществлялось при обработке семян растворами регулятора роста с концентрациями 10^{-5} и 10^{-4} %. Системный анализ полученных данных показал эффективность протестированного регулятора роста при концентрациях в растворе на порядок меньших, чем концентрация раствора 3-индолилмасляной кислоты (в контроле). Интересно отметить, что увеличение концентрации регулятора роста до значений 10^{-4} % вызывает подавление роста вегетативных органов растения. Кроме того, найдено, что фуллереновый регулятор роста сильнее влияет на длину надземной части, чем на массу и размер корневой системы. Отмечено, что в целом аддукт фуллерена с концентрацией в растворе 10^{-5} % проявляет свойства стимулятора ауксинного типа, и его действующая низкая концентрация объяснима ускоренным перемещением остатка 3-индолилмасляной кислоты к рецепторам за счет высокого сродства молекулы фуллерена к клеточным структурам (Игуменова и др., 2016).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приводимые в настоящем обзоре данные позволяют заключить, что действие фуллерена и его производных на растения зависит от значительного количества факторов: способа обработки, наличия стрессовых условий, концентрации и проч. В частности, внесение фуллерена в почву не дает эффекта либо оказывает негативное действие на рост и развитие растения, в отличие от обработки растения или семян раствором. Водорастворимые производные фуллеренов обладают большей проникающей способностью, значительно влияют на метаболизм растения и в основном оказывают стимулирующее действие на рост

растения и урожайность вне зависимости от способа обработки, однако наблюдается дозовая зависимость. Фигурирующие в обзоре результаты исследований свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения механизмов влияния углеродных наноструктур, в частности производных фуллеренов, на растения с целью создания высокоэффективных экологически безопасных биологически активных препаратов комплексного действия для использования их в растениеводстве.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Безмельницын В.Н., Елецкий А.В., Окунь М.В.* Фуллерены в растворах // Успехи физ. наук. 1998. Т. 168. № 11. С. 1195–1220.
- Волков В.А., Ямскова О.В., Воронков М.В. и др.* Новые стимуляторы роста растений на основе водорастворимых наночастиц *N*-замещенных моноаминокислотных производных фуллерена C_{60} и изучение механизма их действия // Биофизика. 2020. Т. 65. № 4. С. 745–752.
- Думпис М.А., Литасова Е.В., Ильин В.В. и др.* Продукты взаимодействия аминокислот с фуллереном C_{60} // Изв. СПбГТИ (ТУ). 2014. № 24. С. 32–34.
- Думпис М.А., Николаев Д.Н., Литасова Е.В. и др.* Биологическая активность фуллеренов – реалии и перспективы // Обз. клин. фармакол. лекарств. терапии. 2018. Т. 16. № 1. С. 4–20.
- Елецкий А.В., Смирнов Б.М.* Кластер C_{60} – новая форма углерода // Успехи физ. наук. 1991. Т. 161. № 7. С. 173–192.
- Елецкий А.В., Смирнов Б.М.* Фуллерены // Успехи физ. наук. 1993. Т. 163. № 2. С. 33–60.
- Елецкий А.В., Смирнов Б.М.* Фуллерены и структура углерода // Успехи физ. наук. 1995. Т. 165. № 9. С. 977–1009.
- Зайцев В.И., Корсакова О.М., Хорошайлов Н.Г. и др.* ГОСТ 12038-84. Межгосударственный стандарт. Семени сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. М.: Стандартинформ, 2011. 64 с.
- Запрометов М.Н.* Фенольные соединения. Распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. 272 с.
- Игуменова Т.И., Чичварин А.В., Синявин М.С., Елина А.С.* Способ получения аддуктов смеси фуллеренов фракции C_{50} – C_{92} и регулятор роста растений на их основе. Патент РФ № 2581658. Пер. 10.02.2014. Опубл. 20.04.2016.
- Молчан О.В., Обуховская Л.В., Реутский В.Г.* Влияние фуллеренола на прорастание семян, содержание фенольных соединений и их антирадикальную активность в проростках ячменя // Труды БГУ. Физиол. биохим. мол. осн. функцион. биосист. 2014. Т. 9. Ч. 1. С. 56–61.
- Мчедлов-Петросян Н.О.* Растворы фуллерена C_{60} : коллоидный аспект // Хімія, фізика та технологія поверхні. 2010. Т. 1. № 1. С. 19–37.
- Лукацкий А.С.* Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. 1. Образование активированных форм кислорода при охлаждении растений // Физиол. раст. 2002. Т. 49. № 5. С. 697–702.
- Обручева Н.В., Антипова О.В.* Физиология инициации прорастания семян // Физиол. раст. 1997. Т. 44. № 2. С. 287–302.
- Панова Г.Г., Синявина Н.Г., Скобелева О.В. и др.* Наноматериал фуллеренол d – перспективы использования в растениеводстве // Сб. мат. “Научная сессия по итогам 2012 г. Агрофизического института” (СПб., 2–3 апреля 2013 г.). СПб.: АНИИ РАСХН, 2013. С. 68–74.
- Панова Г.Г., Семенов К.Н., Шилова О.А. и др.* Водорастворимые производные фуллеренов и кремнезольные наноконпозиции как перспективные наноматериалы для использования в растениеводстве // Агрофизика. 2015. № 4. С. 37–48.
- Панова Г.Г., Канаш Е.В., Семенов К.Н. и др.* Производные фуллерена стимулируют продукционный процесс, рост и устойчивость к окислительному стрессу у растений пшеницы и ячменя // С.-х. биол. 2018. Т. 53. № 1. С. 38–49.
- Романова В.С., Цырякин В.А., Ляховецкий Ю.И. и др.* Присоединение аминокислот и дипептидов к фуллерену C_{60} с образованием моноаддуктов // Изв. АН. Сер. хим. 1994. № 6. С. 1154–1155.
- Якушев В.П., Канаш Е.В., Осипов Ю.А. и др.* Оптические критерии при контактной и дистанционной диагностике состояния посевов пшеницы и эффективности фотосинтеза на фоне дефицита минерального питания // С.-х. биол. 2010. Т. 45. № 3. С. 94–101.
- Ямскова О.В., Кондратьева В.В., Воронкова Т.В. и др.* Влияние коллоидного водного раствора фуллерена C_{60} как экологически безопасного регулятора роста на прорастание семян и урожайность пшеницы // Технол. товаровед. инновац. пищ. прод. 2019а. Т. 3. № 56. С. 39–45.
- Ямскова О.В., Колягин Ю.Г., Романова В.С. и др.* Твердотельный ЯМР аминокислотных производных фуллерена C_{60} // Журн. физ. химии. 2019б. Т. 93. № 2. С. 266–268.
- Adeel M., Farooq T., White J.C. et al.* Carbon-based nanomaterials suppress tobacco mosaic virus (TMV) infection and induce resistance in *Nicotiana benthamiana* // J. Hazard. Mater. 2021. V. 404. Pt A. P. 124167.
- Ahmadi S.Z., Ghorbanpour M., Aghaee A., Hadian J.* Deciphering morpho-physiological and phytochemical attributes of *Tanacetum parthenium* L. plants exposed to C_{60} fullerene and salicylic acid // Chemosphere. 2020. V. 259. P. 127406.
- Andrievsky G.V., Kosevich M.V., Vovk O.M. et al.* On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes //

- J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1995. V. 8. № 12. P. 1281–1282.
- Andrievsky G.V., Klochkov V.K., Karyakina E.L., Mchedlov-Petrosyan N.O. Studies of aqueous colloidal solutions of fullerene C₆₀ by electron microscopy // Chem. Phys. Lett. 1999. V. 300. № 3–4. P. 392–396.
- Andrievsky G.V., Klochkov V.K., Bordyuh A.B., Dovbeshko G.I. Comparative analysis of two aqueous-colloidal solutions of C₆₀ fullerene with help of FTIR reflectance and UV-Vis spectroscopy // Chem. Phys. Lett. 2002. V. 364. № 1–2. P. 8–17.
- Andrievsky G.V., Klochkov V.K., Derevyanchenko L.I. Is C₆₀ fullerene molecule toxic?! // Fuller. Nanotub. Carb. Nanostruct. 2005. V. 13. № 4. P. 363–376.
- Avanasi R., Jackson W.A., Sherwin B. et al. C₆₀ fullerene soil sorption, biodegradation, and plant uptake // Environ. Sci. Technol. 2014. V. 48. № 5. P. 2792–2797.
- Aslani F., Bagheri S., Julkapli N.M. et al. Effects of engineered nanomaterials on plants growth: an overview // Sci. World J. 2014. Art. ID 641759. 28 p.
- Beuerle F., Lebovitz R., Hirsch A. Antioxidant properties of water-soluble fullerene derivatives // Medicinal chemistry and pharmacological potential of fullerenes and carbon nanotubes / Eds F. Cataldo, T. Da Ros. Dordrecht: Springer, 2008. P. 51–78.
- Bityutskii N.P., Yakkonen K.L., Lukina K.A., Semenov K.N. Fullerene increases effectiveness of foliar iron fertilization in iron-deficient cucumber // PLoS One. 2020. V. 15. № 5. P. e0232765.
- Bityutskii N.P., Yakkonen K.L., Puzanskiy R. et al. Fullerene changes metabolite responses differently depending on the iron status of cucumber plants // PLoS One. 2021a. V. 16. № 5. P. e0251396.
- Bityutskii N.P., Yakkonen K.L., Lukina K.A. et al. Fullerene can ameliorate iron deficiency in cucumber grown hydroponically // J. Plant Growth Regul. 2021b. V. 40. № 3. P. 1017–1031.
- Bityutskii N.P., Yakkonen K.L., Lukina K.A., Semenov K.N. Fullerene affects maize plants depending on their iron status // Biol. Plantarum. 2022. V. 66. № 5. P. 76–82.
- Brant J.A., Labille J., Robichaud C.O., Wiesner M. Fullerene cluster formation in aqueous solutions: implications for environmental release // J. Coll. Interface Sci. 2007. V. 314. № 1. P. 281–288.
- Chen R., Ratnikova T.A., Stone M.B. et al. Differential uptake of carbon nanoparticles by plant and mammalian cells // Small. 2010. V. 6. № 5. P. 612–617.
- Chiang L.Y., Wang L.Y., Swirczewski J.W. et al. Efficient synthesis of polyhydroxylated fullerene derivatives via hydrolysis of polycyclohexane precursors // J. Org. Chem. 1994. V. 59. Iss. 14. P. 3960–3968.
- Chiang L.Y., Bhonsle J.B., Wang L. et al. Efficient one-flask synthesis of water-soluble [60]fullerenols // Tetrahedron. 1996. V. 52. № 14. P. 4963–4972.
- Curl R.F., Smalley R.E. Probing C₆₀ // Science. 1988. V. 242. № 4881. P. 1017–1022.
- De La Torre-Roche R., Hawthorne J., Deng Y.Q. et al. Fullerene-enhanced accumulation of *p,p'*-DDE in agricultural crop species // Environ. Sci. Technol. 2012. V. 46. № 17. P. 9315–9323.
- De La Torre-Roche R., Hawthorne J., Deng Y.Q. et al. Multiwalled carbon nanotubes and C₆₀ fullerenes differentially impact the accumulation of weathered pesticides in four agricultural plants // Environ. Sci. Technol. 2013. V. 47. № 21. P. 12539–12547.
- Gao J., Wang Y.H., Folta K.M. et al. Polyhydroxy fullerenes (fullerols or fullerlenols): beneficial effects on growth and lifespan in diverse biological models // PLoS One. 2011. V. 6. № 5. P. e19976.
- Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M. et al. [60]Fullerene is a powerful antioxidant *in vivo* with no acute or subacute toxicity // Nano Lett. 2005. V. 5. № 12. P. 2578–2585.
- He A.F., Jiang J., Ding J., Sheng G.D. Blocking effect of fullerene nanoparticles (nC₆₀) on the plant cell structure and its phytotoxicity // Chemosphere. 2021. V. 278. P. 130474. 10 p.
- Hirsch A. Fullerenes and related structures. Berlin: Springer, 2013. 248 p.
- Husen A., Siddiqi K.S. Carbon and fullerene nanomaterials in plant system // J. Nanobiotechnol. 2014. V. 12. P. 16.
- Kanash E.V., Panova G.G., Blokhina S.Yu. Optical criteria for assessment of efficiency and adaptogenic characteristics of biologically active preparations // Acta Horticulturae. 2013. № 1009. P. 37–44.
- Kelsey J.W., White J.C. Effect of C₆₀ fullerenes on the accumulation of weathered *p,p'*-DDE by plant and earthworm species under single and multispecies conditions // Environ. Toxicol. Chem. 2013. V. 32. № 5. P. 1117–1123.
- Khodakovskaya M.V., Kim B.S., Kim J.N. et al. Carbon nanotubes as plant growth regulators: effects on tomato growth, reproductive system, and soil microbial community // Small. 2013. V. 9. № 1. P. 115–123.
- Kokubo K., Matsubayashi K., Tategaki H. et al. Facile synthesis of highly water-soluble fullerenes more than half-covered by hydroxyl groups // ACS Nano. 2008. V. 2. № 2. P. 327–333.
- Kole C., Kole P., Randunu K.M. et al. Nanobiotechnology can boost crop production and quality: first evidence from increased plant biomass, fruit yield and phytochemistry content in bitter melon (*Momordica charantia*) // BMC Biotechnol. 2013. V. 13. P. 37.
- Kumar S., Patra A.K., Datta S.C. et al. Phytotoxicity of nanoparticles to seed germination of plants // Int. J. Adv. Res. 2015. V. 3. № 3. P. 854–865.
- Lamparth I., Hirsch A. Water-soluble malonic acid derivatives of C₆₀ with a defined three-dimensional structure // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1994. Iss. 14. P. 1727–1728.
- Lang J., Melnykova M., Catania M. et al. A water-soluble [60]fullerene-derivative stimulates chlorophyll accumulation and has no toxic effect on *Chlamydomonas reinhardtii* // Acta Biochim. Pol. 2019. V. 66. № 3. P. 257–262.
- Li J., Takeuchi A., Ozawa M. et al. C₆₀ fullerol formation catalysed by quaternary ammonium hydroxides // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1993. Iss. 23. P. 1784–1785.
- Li D., Lyon D.Y., Li Q.L., Alvarez P.J.J. Effect of soil sorption and aquatic natural organic matter on the antibacterial activity of a fullerene water suspension // Environ. Toxicol. Chem. 2008. V. 27. № 9. P. 1888–1894.
- Lin S.J., Reppert J., Hu Q. et al. Uptake, translocation, and transmission of carbon nanomaterials in rice plants // Small. 2009. V. 5. № 10. P. 1128–1132.
- Liu Q.L., Zhao Y.Y., Wan Y.L. et al. Study of the inhibitory effect of water-soluble fullerenes on plant growth at the cellular level // ACS Nano. 2010. V. 4. № 10. P. 5743–5748.
- Liu Q.L., Zhang X.J., Zhao Y.Y. et al. Fullerene-induced increase of glycosyl residue on living plant cell wall // Environ. Sci. Technol. 2013. V. 47. № 13. P. 7490–7498.
- Liu Y.J., Wang T.T., Cao J.H. et al. Quaternary ammonium salts of iminofullerenes: fabrication and effect on seed

- germination // *J. Agric. Food Chem.* 2019. V. 67. № 49. P. 13509–13517.
- Ma X.M., Wang C. Fullerene nanoparticles affect the fate and uptake of trichloroethylene in phytoremediation systems // *Environ. Eng. Sci.* 2010. V. 27. № 11. P. 989–992.
- Mchedlov-Petrosyan N.O. Fullerenes in liquid media: an unsettling intrusion into the solution chemistry // *Chem. Rev.* 2013. V. 113. № 7. P. 5149–5193.
- Nair R., Varghese S.H., Nair B.G. et al. Nanoparticulate material delivery to plants // *Plant Sci.* 2010. V. 179. № 3. P. 154–163.
- Noctor G., De Paepe R., Foyer C.H. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants // *Trends Plant Sci.* 2007. V. 12. № 3. P. 125–134.
- Ozfidan-Konakci C., Alp F.N., Arikan B. et al. The effects of fullerene on photosynthetic apparatus, chloroplast-encoded gene expression, and nitrogen assimilation in *Zea mays* under cobalt stress // *Physiol. Plant.* 2022a. V. 174. № 3. P. e13720.
- Ozfidan-Konakci C., Alp F.N., Arikan B. et al. The biphasic responses of nanomaterial fullerene on stomatal movement, water status, chlorophyll *a* fluorescence transient, radical scavenging system and aquaporin-related gene expression in *Zea mays* under cobalt stress // *Sci. Tot. Environ.* 2022b. V. 826. P. 154213.
- Panova G.G., Kitorova I.N., Skobeleva O.V. et al. Impact of polyhydroxy fullerene (fullerol or fulleranol) on growth and biophysical characteristics of barley seedlings in favourable and stressful conditions // *Plant Growth Regul.* 2016. V. 79. № 3. P. 309–317.
- Panova G.G., Kanash E.V., Khomyakov Yu.V. et al. Bioactivity study of the C₆₀-L-threonine derivative for potential application in agriculture // *J. Nanomaterials.* 2019. V. 2019. P. 2306518.
- Panova G.G., Zhuravleva A.S., Khomyakov Yu.V. et al. Plant impact properties of carboxylated fullerene C₆₀[C(COOH)₂]₃ // *J. Mol. Struct.* 2021. V. 1235. P. 130163.
- Purvis A.C., Shewfelt R.L., Gegogaine J.W. Superoxide production in mitochondria isolated from green bell pepper fruit // *Physiol. Plant.* 1995. V. 94. P. 743–749.
- Rico C.M., Majumdar S., Duarte-Gardea M. et al. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain // *J. Agric. Food Chem.* 2011. V. 59. № 8. P. 3485–3498.
- Rudalevige T., Francis A.H., Zand R. Spectroscopic studies of fullerene aggregates // *J. Phys. Chem. A.* 1998. V. 102. № 48. P. 9797–9802.
- Santos S.M.A., Dinis A.M., Rodrigues D.M.F. et al. Studies on the toxicity of an aqueous suspension of C₆₀ nanoparticles using a bacterium (gen. *Bacillus*) and an aquatic plant (*Lemna gibba*) as *in vitro* model systems // *Aquat. Toxicol.* 2013. V. 142–143. P. 347–354.
- Semenov K.N., Charykov N.A., Keskinov V.N. Fulleranol: synthesis and identification. Properties of the fulleranol water solutions // *J. Chem. Eng. Data.* 2011. V. 56. № 2. P. 230–239.
- Shafiq F., Iqbal M., Ali M., Ashraf M.A. Fulleranol regulates oxidative stress and tissue ionic homeostasis in spring wheat to improve net-primary productivity under salt-stress // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2021. V. 211. P. 111901.
- Tao X.J., Yu Y.X., Fortner J.D. et al. Effects of aqueous stable fullerene nanocrystal (nC₆₀) on *Scenedesmus obliquus*: evaluation of the sub-lethal photosynthetic responses and inhibition mechanism // *Chemosphere.* 2015. V. 122. P. 162–167.
- Tong Z.H., Bischoff M., Nies L. et al. Impact of fullerene (C₆₀) on a soil microbial community // *Environ. Sci. Technol.* 2007. V. 41. № 8. P. 2985–2991.
- Vileno B., Marcoux P.R., Lekka M. et al. Spectroscopic and physical properties of a highly derivatized C₆₀ fullerol // *Adv. Funct. Mater.* 2006. V. 16. № 1. P. 120–128.
- Wang C.L., Zhang H., Ruan L.F. et al. Bioaccumulation of ¹³C-fulleranol nanomaterials in wheat // *Environ. Sci. Nano.* 2016. V. 3. Iss. 4. P. 799–805.
- Yin J.J., Lao F., Fu P.P.C. et al. The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials // *Biomaterials.* 2009. V. 30. № 4. P. 611–621.
- Zaytseva O., Neumann G. Carbon nanomaterials: production, impact on plant development, agricultural and environmental applications // *Chem. Biol. Technol. Agric.* 2016. V. 3. P. 17.
- Zha Y.Y., Yang B., Tang M.L. et al. Concentration-dependent effects of fulleranol on cultured hippocampal neuron viability // *Int. J. Nanomed.* 2012. V. 7. P. 3099–3109.

Effects of the Impact of Water-Soluble Forms of Fullerenes and Their Derivatives on Plants Metabolism and Yield of Agricultural Crops

O. V. Yamskova^{a, *}, D. V. Kurilov^b, I. V. Zavarzin^b, M. S. Krasnov^a, and T. V. Voronkova^c

^aNesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^bZelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^cTsitsin Main Botanical Garden, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

*e-mail: olga_yamskova@mail.ru

The search for effective and environmentally friendly plant growth regulators in modern conditions makes it possible to identify and reduce the impact on plant development, its metabolic processes, the biomass of its various parts and crops. Substances with the least toxicity to living organisms, which are of particular interest in this field, in particular, these include C₆₀, C₇₀ fullerenes and their derivatives. This paper describes the impact of both fullerenes themselves and their derivatives on plant growth, yield, effects, metabolic and morphological changes observed depending on the processing methods, the chemical structure of the derivative, and the amount of substance used for processing.

Keywords: water-soluble fullerene derivatives, plant growth stimulant, root treatment, foliar treatment, plant stress

НЕКОТОРЫЕ МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ВЫЯВЛЕНИЮ ЖАРОУСТОЙЧИВЫХ ГЕНОТИПОВ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ (НА ПРИМЕРЕ ХЛЕБНЫХ ЗЛАКОВ)

© 2023 г. Н. Н. Круглова¹, *, А. Е. Зинатуллина¹

¹Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

*e-mail: kruglova@anrb.ru

Поступила в редакцию 24.10.2022 г.

После доработки 07.11.2022 г.

Принята к публикации 08.11.2022 г.

Проблема устойчивости культурных растений к жаре как действию повышенных температур воздуха, ведущему к физиологической засухе, чрезвычайно актуальна не только в условиях прогнозируемой аридизации климата, но и при изучении действия сравнительно кратковременных волн жары (heat waves). Современная селекция ориентирована на создание высокоурожайных жароустойчивых сортов культурных растений, особенно хлебных злаков как основного мирового продовольственного ресурса. При селекционных разработках необходимо предварительно выявить жароустойчивые генотипы хлебных злаков для их включения в соответствующие программы. В статье дан критический анализ ряда представленных в литературе подходов к выявлению таких генотипов (моделирование действия стрессового фактора повышенных температур воздуха в экспериментальных условиях *in situ*; использование в таких условиях пыльников как генеративных структур, более чувствительных к воздействию данного стрессового фактора, в сравнении с вегетативными органами), которые можно оценить как методологические. Кроме того, с позиции описательной и экспериментальной эмбриологии растений в качестве перспективного методологического подхода предложено использование взаимосвязанных концепций (в разработке Т.Б. Батыгиной): оценка пыльника как сложной интегрированной системы тканей и наличие критических стадий в развитии этой системы.

Ключевые слова: абиотические стрессы, жара, физиологическая засуха, моделирование жары, пыльник как интегрированная система, критические стадии развития пыльника, хлебные злаки

DOI: 10.31857/S0042132423020060, **EDN:** KMFUPS

ВВЕДЕНИЕ

Физиологическая засуха расценивается как абиотический стрессовый фактор, под воздействием которого растения испытывают длительный водный дефицит в воздухе и почве (Zahoog et al., 2020). Засуха может быть вызвана различными причинами, в том числе действием повышенных температур воздуха (Jagadish, 2020; Khan et al., 2020; Jagadish et al., 2021; Gyawali et al., 2021). Проблема устойчивости культурных растений к такому виду засухи (а именно жароустойчивость) чрезвычайно актуальна в условиях прогнозируемой аридизации климата (Hussain et al., 2018; Climate change..., 2020) и определяет необходимость многочисленных исследований, ставящих целью выявить различные аспекты воздействия высокотемпературной засухи на рост и развитие растений (Raveena et al., 2019; Sakkar et al., 2019;

Sallam et al., 2019; Sattar et al., 2019; Lamers et al., 2020; Chowdhury et al., 2021; Gyawali et al., 2021; Zhan et al., 2022).

Большое значение исследователями в этой связи придается и изучению действия на растения так называемых волн жары (heat waves) — относительно кратковременного воздействия температур воздуха выше оптимальных (Li et al., 2020) — достаточно распространенных не только в засушливых, но и полузасушливых регионах. Стрессовая реакция растений на воздействие таких волн активно анализируется в современной литературе. Так, в редакторской статье специального выпуска журнала “Plant, cell & environment” (2021, V. 44, № 7) подчеркивается большой интерес исследователей к краткосрочным и долгосрочным последствиям их воздействия — от клеточного уровня до уровня экосистем (Jagadish et al., 2021).

В литературе представлено немало работ, посвященных анализу способов преодоления самими растениями воздействия абиотического стрессового фактора засухи, вызванной повышенными температурами воздуха. Это и стратегии избегания засухи (Basu et al., 2016; Jagadish, 2020), и реализация различных морфологических, физиологических и биохимических адаптационных механизмов (Yadav, Sharma, 2016; Plant life..., 2020; Jogawat et al., 2021; Kandel, 2021; Yadav et al., 2021; Kumar et al., 2022; Marone et al., 2022). В то же время и современная селекция ориентирована на создание высокоурожайных жароустойчивых сортов культурных растений, особенно хлебных злаков как основного мирового продовольственного ресурса. В этой области разрабатываются направления селекции как традиционные (Драгавцев, 2019; Abdolshahi et al., 2015), так и основанные на данных, полученных методами культуры *in vitro* клеток, тканей и органов, геномной инженерии, редактирования генома, а также omics-методами (Дубровная, 2017; Пикало и др., 2020; Khan et al., 2019; Maleki et al., 2019; Leng, Zhao, 2020; Liu et al., 2020; Guo et al., 2021; Wu et al., 2022). При всех направлениях селекционных разработок необходимо предварительно выявить жароустойчивые генотипы хлебных злаков для включения их в соответствующие программы.

Безусловно, выявлять жароустойчивые генотипы злаков следует в полевых условиях при непосредственном воздействии стрессового фактора повышенных температур воздуха. Однако такого рода исследования сравнительно немногочисленны (Шаманин и др., 2016; Алабушев и др., 2019; Prasad et al., 2017; Lv et al., 2018; Lawas et al., 2019; Demydov et al., 2021; El-Mowafi et al., 2021; Ali, Akmal, 2022), поскольку ограничены значительными методическими трудностями: короткий вегетационный сезон, невозможность создать контроль проводимых экспериментов, трудоемкость наблюдений и др. Кроме того, год от года могут меняться характер и степень воздействия изучаемого стрессового фактора.

Перспективное направление выявления жароустойчивых генотипов злаков состоит в использовании данных, полученных в экспериментальных условиях *in situ* (климатические камеры, фитотроны, теплицы). Этому вопросу посвящена обширнейшая литература, при этом предложены некоторые подходы, которые можно расценить как методологические. Цель данной статьи, являющейся продолжением цикла обзоров авторов (Круглова и др., 2018; Зинатуллина, 2020; Круглова, Зинатуллина, 2021; Зинатуллина et al., 2018; Kruglova, Zinatlina, 2022), состоит в критическом анализе обоснования ряда методологических подходов к экспериментальному выявлению жароустойчивых генотипов злаков на основе использования таких генеративных структур, как пыльники.

Отметим, что в статье приведены данные преимущественно последних пяти лет, хотя в литературе представлен большой экспериментальный материал по этой теме, полученный в разные годы.

Статья посвящена 95-летию со дня рождения чл.-кор. РАН Татьяны Борисовны Батыгиной (1927–2015), внесшей значительный вклад в разработку методологии изучения различных генеративных и эмбриональных структур цветковых растений.

НЕКОТОРЫЕ МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ВЫЯВЛЕНИЮ ЖАРОУСТОЙЧИВЫХ ГЕНОТИПОВ ХЛЕБНЫХ ЗЛАКОВ

Моделирование воздействия стрессового фактора повышенных температур воздуха в экспериментальных условиях in situ

Один из представленных в литературе подходов при выявлении жароустойчивых генотипов хлебных злаков – использование климатических камер, фитотронов и теплиц.

По отношению к изучению действия повышенных температур воздуха, такой подход, безусловно, методологически верен. Действительно, экспериментальные условия *in situ*, позволяющие задать контролируемый режим температур воздуха выше оптимальных, дают возможность моделировать воздействие такого вида засухи и выявить жароустойчивые генотипы. Кроме того, на примере многих сельскохозяйственных культур, в том числе злаков (Liu et al., 2018; Qaseem et al., 2018; Li et al., 2020; Brás et al., 2021; Da Costa et al., 2021; Langridge, Reynolds, 2021), продемонстрировано сходство ответных реакций различных органов растений как на относительно кратковременное, так и длительное стрессовое воздействие повышенных температур воздуха. Это позволяет исследовать в модельных условиях *in situ* адаптивные молекулярные, клеточные и тканевые механизмы жаро- и засухоустойчивости растений (Yadav et al., 2019; Zahoor et al., 2020; Wu et al., 2021; Chen et al., 2022), знание о которых крайне важно для современных селекционных исследований.

Основным же преимуществом такого подхода, по нашему мнению, следует считать сходство морфогенетических реакций всего растения в естественных *in vivo* и экспериментальных (в том числе стрессовых) *in situ* условиях, согласно принципу универсальности морфогенеза растений (Батыгина, 2014).

Использование в модельных экспериментах in situ пыльников как генеративных структур, наиболее чувствительных к воздействию повышенных температур воздуха

Для выявления жароустойчивых генотипов хлебных злаков в модельных экспериментах *in situ* в литературе предложен подход, состоящий в использовании пыльников, и этот подход также можно считать методологическим.

Известно, что пыльник представляет собой фертильную часть тычинки, в микроспорангиях которой происходит микроспорогенез, образуются и созревают пыльцевые зерна, содержащие мужские гаметы – спермии. В сформированном виде эта генеративная структура представлена небольшим числом тканей (спорогенная ткань и ткани стенки гнезда: тапетум, эндотечий, средний слой, экзотечий), имеющих общее происхождение (Камелина, 2009; Åstrand et al., 2021).

В результате многочисленных исследований, проведенных как в естественных условиях *in vivo*, так и в экспериментах *in situ*, установлено, что органы злаков по-разному реагируют на стрессовое воздействие жары, при этом именно цветок и его части более чувствительны к повышенным температурам воздуха, по сравнению с вегетативными органами (Mesihovic et al., 2016; Fábíán et al., 2019; Jagadish, 2020; Sinha et al., 2021). Особенно восприимчивы к высоким температурам воздуха пыльники (Matsui, Hasegawa, 2019; Yu et al., 2019; Fernández-Gómez et al., 2020; Browne et al., 2021; Khlaimongkhon et al., 2021; Kumar et al., 2022). Развитие пыльцевого зерна оценивается в этой связи как “самое слабое звено” (Lohani et al., 2020, с. 558), поскольку индуцируемое температурным стрессом фактором снижение жизнеспособности пыльцы, вплоть до ее стерильности (Feng et al., 2018; Begcy et al., 2019; Schindfessel et al., 2021; Ullah et al., 2022), безусловно, значительно влияет на репродуктивный успех (Zhang et al., 2018; Bheemanahalli et al., 2020; van Es, 2020; Hu et al., 2021). В целом, репродуктивную стадию с этих позиций относят к критическим периодам онтогенеза растений (Zhang et al., 2021).

Экспериментально выявлено, что оптимальная температура воздуха для развития пыльников злаков составляет 24–28°C (Khan et al., 2020). Температура на 5–15°C выше этого показателя, даже при кратковременном воздействии в условиях как *in vivo*, так и *in situ*, вызывает стресс в пыльниках, что приводит к негативным изменениям их физиолого-биохимических (увеличение содержания гормона стресса абсцизовой кислоты, синтез активных форм кислорода и белков теплового шока, дезактивация ферментов фотосинтеза, нарушение липидного и углеводного обмена, снижение уровня митохондриального дыхания и др.) и молекулярно-генетических (нарушение

экспрессии генов, участвующих в регуляции транскрипции, транспорта и метаболизма 3-индолилуксусной и гиббереллиновой кислот как важнейших гормонов морфогенеза и др.) показателей. Такое температурное воздействие ведет и к нарушению ряда морфологических (появление пыльцевых зерен, деградировавших на той или иной стадии развития) и даже количественных (уменьшение количества фертильных пыльцевых зерен в зрелом пыльнике) параметров. Детальный анализ этих вопросов на примере различных растений, в том числе злаков, представлен во многих обзорах последних лет (Круглова, 2022б; Gahlaut et al., 2016; Mesihovich et al., 2016; Baillo et al., 2019; Kimotho et al., 2019; Bheemanahalli et al., 2020; Lohani et al., 2020; Khan et al., 2020; Chaturvedi et al., 2021; Gyawali et al., 2021; Zhang et al., 2021), и мы отсылаем заинтересованного читателя как к этим обзорам, так и к включенным в них публикациям.

В то же время хотелось бы обратить особое внимание на перспективный, по нашему мнению, методологический подход – сравнение некоторых молекулярно-генетических показателей пыльников заведомо жароустойчивых и жарочувствительных сортов злаков при воздействии высокотемпературного стресса в экспериментах *in situ*. Этот подход напрямую не связан с выявлением жароустойчивых генотипов, однако позволяет выявить гены и генные сети, имеющие решающее значение в адаптации растений к высоким температурам воздуха. Полученные данные важны не только в целях молекулярной селекции жароустойчивых генотипов злаков, но и в изучении генетических особенностей развития генеративных структур растений в экстремальных условиях. Так, у жароустойчивого сорта риса методом РНК-секвенирования зрелых пыльников выявлена активизация ряда генов, кодирующих белки-шапероны теплового шока (González-Schain et al., 2016). Использование наборов транскриптомных данных, полученных на основе использования микрочипов и результатов РНК-секвенирования пыльников жароустойчивых сортов этого же злака, позволило выявить 45 генов-кандидатов для ускоренной селекции генотипов, устойчивых к жаре. При этом исследователи высказали мнение о существовании у риса регуляторного механизма смягчения стрессового воздействия повышенных температур воздуха на репродуктивной стадии (Raza et al., 2020). Транскриптомный анализ выявил ряд экспрессируемых в пыльниках жароустойчивых сортов пшеницы ключевых генов, участвующих не только в реакции на температурный шок путем активации биосинтеза некоторых гормонов (ауксин, этилен, гиббереллин), но и в развитии пыльников (Browne et al., 2021). Интересно, что и в полевых условиях засухи экспрессия генов биосинтеза гормона стресса абсцизовой кислоты индуцировалась сильнее в пыльниках жароустойчивых сор-

тов пшеницы, в сравнении с пыльниками жаро-чувствительных сортов (Zhang et al., 2021).

Сравнительный анализ показателей пыльников заведомо жароустойчивых и жарочувствительных сортов злаков в условиях высокотемпературного экспериментального стресса *in situ* проводится и по некоторым физиолого-биохимическим параметрам. Так, у жароустойчивого и жарочувствительного сортов риса в условиях теплового стресса выявлены контрастные метаболомные изменения в органах цветка (включая пыльники), при этом идентифицированы метаболические маркеры, определяющие репродуктивный успех, продемонстрирована важная роль метаболизма сахаров в формировании жароустойчивости цветков (Li et al., 2015). Методом масс-спектрометрии в обработанной высокими температурами зрелой пыльце жароустойчивого сорта риса показано значительное содержание фосфатидилинозитола (предшественник фосфоинозотида, индуцирующего передачу сигналов для прорастания пыльцы), при полном его отсутствии в пыльце жарочувствительного сорта (Wada et al., 2020). Интересно, что даже без высокотемпературного воздействия метаболическое профилирование пыльников жарочувствительного сорта пшеницы выявило значительное содержание в них ряда аминокислот и гормона стресса абсцизовой кислоты при невысоком содержании полиаминов и органических кислот (Vheemanahalli et al., 2020); аналогичные результаты получены для риса (Zhang et al 2021).

Все эти результаты свидетельствуют в пользу возможности выявления в условиях *in situ* специфических молекулярно-генетических/физиолого-биохимических маркеров как для разработки способов повышения устойчивости злаков к тепловому стрессу, так и для быстрой диагностики жароустойчивых генотипов в селекционных целях.

Использование концепций эмбриологии растений в оценке стрессового воздействия повышенных температур воздуха на пыльники злаков in situ

Пыльник — предмет исследований эмбриологии растений (Камелина, 2009). Поэтому еще одним методологическим подходом к выявлению жароустойчивых генотипов злаков в экспериментальных условиях *in situ*, по нашему предложению, может стать использование разработанных с позиции описательной и экспериментальной эмбриологии растений взаимосвязанных концепций: оценка пыльника как интегрированной системы и анализ критических стадий развития этой генеративной структуры.

Обе эти концепции детально разработаны Т.Б. Батыгиной (обобщение: Батыгина, 2014). Исследователь рассматривает пыльник цветковых растений как сложную интегрированную систему,

представленную следующими элементами: спорогенная ткань и ткани стенки гнезда пыльника (тапетум, эндотеций, средний слой, экзотеций), при этом свойства пыльника как системы не сводимы к простой сумме свойств элементов-тканей.

В результате детального цитогистологического анализа развивающихся пыльников пшеницы выявлено (Батыгина, 2014), что клетки спорогенной ткани и тканей стенки гнезда, происходящие от общих инициалей, с самых ранних стадий морфогенеза развиваются взаимосвязано и сопряженно, морфологически и структурно достигая высокой специализации, связанной с выполнением их основных функций. Каждая из тканей стенки гнезда пыльника играет свою роль в ходе развития спорогенных клеток, дающих начало пыльцевым зернам. Исследователем сделан вывод о том, что пыльники как интегрированные структуры обладают общими регуляторными механизмами и единым ритмом развития элементов, при этом нормальный ход развития клеток спорогенной ткани, дающих начало пыльцевым зернам, зависит от нормального функционирования клеток всех тканей стенки гнезда в пределах системы пыльника по принципу части и целого.

Подтверждение такой общности регуляторных механизмов развития элементов-тканей в единой системе пыльника можно видеть, например, в ряде публикаций, выполненных на примере риса, хотя сами авторы понятие “система” по отношению к пыльнику не используют. Так, выявлено, что ключевые гены морфогенеза пыльника этого злака активируются каскадно строго на определенных стадиях дифференциации тканей стенки гнезда пыльника в координации с процессами микроспоро- и микрогаметогенеза (Zhang et al., 2011), возможно, по принципу обратной связи, как это показано для арабидопсиса (Huang et al., 2016). В работе, посвященной анализу участия в развитии пыльника риса протеинкиназы OsCPK29, показано, что этот фермент в норме вырабатывается в зрелых пыльцевых зернах, тогда как подавление его функционирования приводит не только к формированию нежизнеспособных пыльцевых зерен за счет нарушений развития интины в их оболочках, но и к аномалиям в структуре клеток эндотеция (Ranjan et al., 2022). Яркий пример системности пыльника (и не только злаков) — деградация клеток тапетума на стадии зрелого пыльника, когда отпадает необходимость в поставке питательных веществ из этой ткани в развивающиеся пыльцевые зерна; многими авторами деградация клеток тапетума в зрелом пыльнике расценивается как запрограммированная гибель — апоптоз (Khan et al., 2021; Guo et al., 2022). Более того, задержка деградации клеток тапетума ведет к деградации и зрелых пыльцевых зерен, как это выявлено у риса (Lei et al., 2022). На примере пшеницы необходимость системного подхода продемонстрирована и

по отношению к исследованиям пыльников в условиях культуры *in vitro* (Круглова, Зинатуллина, 2018). Показано также, что пыльник как составная часть входит в систему тычинки, являющуюся элементом цветка, который и сам является сложной системой органов и, в свою очередь, представляет собой часть системы растения (Круглова, 2022а).

Предложен (Батыгина, 2014) особый аспект исследований – применение концепции пыльника как интегрированной системы к изучению морфогенеза этих генеративных структур не только в естественных условиях, но и в условиях экспериментов, проводимых с учетом того, что дифференциация тканей пыльника протекает в условиях пыльник–окружающая среда. В контексте данной статьи это означает необходимость исследования стрессового воздействия *in situ* повышенных температур воздуха на пыльник злаков как интегрированную систему. В то же время анализ значительного объема литературных источников по этой теме свидетельствует, что исследователи, как правило, не расценивают пыльники злаков, находящихся в условиях повышенных температур воздуха, в качестве интегрированных систем. Более того, авторы большинства работ анализируют стрессовые реакции только развивающихся пыльцевых зерен без оценки изменений статуса тканей стенки гнезда пыльника. К редким исключениям можно отнести результаты исследований пыльников риса, специально направленных на оценку деградации под действием *in situ* высоких температур воздуха тканей стенки гнезда пыльника и в первую очередь тапетума (Matsui et al., 2005). В обзорной работе (Zhang et al., 2021) сообщается о влиянии теплового стресса на многие процессы развития пыльников ряда злаков, в том числе на функции тканей стенки гнезда (особенно тапетума и экзотеция), приводится анализ нарушения экспрессии соответствующих генов, однако понятие “система пыльника” авторы не используют.

Предложено (Батыгина, 2014) моделирование развития пыльников на основе данных морфофизиологического исследования этих генеративных структур в естественных условиях во время последовательных стадий развития. Как свидетельствует анализ большого количества литературных источников, вопросу стадийности развития пыльника злаков экспериментаторами в целом уделяется достаточное внимание, что обусловлено методической необходимостью при проведении селекционно-генетических, молекулярно-генетических, биотехнологических исследований (Browne et al., 2018; Tang et al., 2018; Pan et al., 2020; Sun S. et al., 2021; Sun Y. et al., 2021). В то же время исследователи, как правило, не рассматривают пыльники как интегрированные системы, не учитывают тесные взаимоотношения развивающихся спорогенной

ткани и тканей стенки гнезда пыльника, а во главу угла ставят только развитие пыльцевого зерна.

Однако ряд публикаций составляет исключение.

Так, при исследовании развития пыльника риса особое внимание уделено ключевым генам, играющим решающую роль в развитии не только пыльцы, но и тканей стенки гнезда пыльника на 14 выделенных авторами стадиях (Zhang et al., 2011).

У риса же выявлены транскрипционные факторы, характерные для различных тканей пыльника на пяти стадиях развития, выделенных авторами (Liu et al., 2022).

В работе, выполненной на примере пшеницы, ячменя, риса и кукурузы, изучена динамика накопления малых РНК во всех тканях пыльников в течение выделяемых исследователями премейотической, мейотической и постмейотической стадий (Bélander et al., 2020).

Высказано мнение о том, что высокие температуры воздуха негативно влияют на пыльники в ходе всех стадий развития (Laza et al., 2022). С этим мнением нельзя не согласиться. В то же время, с позиции эмбриологии растений в морфогенезе пыльников как интегрированных систем выделяют так называемые критические стадии развития на основании критерия повышенной чувствительности пыльника к воздействию внешних стрессовых факторов (Батыгина, 2014; Круглова, 2022б). Отметим, что критерий повышенной чувствительности органов растений к внешнему стрессовому воздействию на определенных стадиях развития, предложенный еще в конце XIX в. (Броунов, 1897, по: Светлов, 1960), разрабатывается и по отношению к развитию зародышей растений (Батыгина, 2014; Круглова и др., 2020, 2022; Kruglova et al., 2020) и животных (Светлов, 1960; Severtsova, Severtsov, 2011, 2012, 2013).

Согласно анализу литературных данных, на основании критерия повышенной чувствительности пыльника к воздействию внешних стрессовых факторов в качестве критических можно выделить две стадии развития этой генеративной структуры у злаков.

Одна из таких стадий соответствует мейозу микроспороцитов. Изучению экспериментального стрессового воздействия *in situ* высокими температурами воздуха на мейотические пыльники злаков посвящено немало исследований. Так, экстремальное температурное воздействие на пыльники ячменя во время мейоза приводило к прекращению биосинтеза ауксинов в микроспороцитах, к остановке экспрессии генов, участвующих в репликации ДНК, в отдельных случаях – к блокированию мейотического деления (Lohani et al., 2020). Мейотические aberrации (нерегулярная сегрегация хромосом, образование межхромосомных мостиков и микроядер), индуцируемые экспериментальным тепловым стрессом, вы-

явлены в микроспороцитах риса (Endo et al., 2009) и пшеницы (Omid et al., 2014). Установлено, что микроспороциты пшеницы особенно чувствительны к высоким температурам во время двух фаз мейоза — интерфазы и лептотены (Draeger, Moore, 2017). Мейоз оказался более уязвимой к воздействию повышенных температур стадией развития пыльника пшеницы, в сравнении с цветением (соответствует стадии зрелого пыльцевого зерна) (Bokshi et al., 2021). Действие *in situ* даже умеренно высоких температур воздуха на пыльники кукурузы, содержащие продукт мейоза — тетрады микроспор, привело к аномалиям морфологии этих клеток, к нарушениям в них биосинтеза крахмала и липидов, а также к снижению ферментативной активности и к деконденсации ДНК (Begcy et al., 2019); авторы назвали эту стадию развития пыльника высокочувствительной, что вполне соответствует термину “критическая”. Аналогичные данные получены для тетрад микроспор в пыльниках ячменя после кратковременного воздействия умеренно высоких температур воздуха (32°C), при этом гибель тетрад микроспор вызывают нарушения формирования каллозной оболочки, окружающей тетрады (Schindfessel et al., 2021). Такие нарушения формирования каллозной оболочки, по нашему мнению, можно расценивать как проявление нарушения системы пыльника под воздействием температурного стресса, поскольку биосинтез каллозы осуществляется при участии тапетума (Камелина, 2009). Подтверждения нарушения системы пыльника в условиях повышенных температур воздуха *in situ* можно видеть и в данных по аномалиям дифференциации тапетума в пыльниках риса, пшеницы и ячменя, вплоть до дегенерации этой ткани, приводившей в конечном счете к стерильности пыльцы (Zhang et al., 2021).

Отметим, что нарушения системы пыльника выявлены у ряда злаков и под действием искусственно-го дефицита воды в экспериментах *in situ*; такой дефицит приводил не только к аномальной вакуолизации клеток тапетума, но и аномальному увеличению размеров клеток среднего слоя, а в целом также вызывал стерильность пыльцы (Yu et al., 2019).

Аналогичные результаты получены и под воздействием стрессового фактора холода на мейотические пыльники риса (González-Schain et al., 2019).

Анализ таких данных позволяет высказать предположение об общности клеточных и тканевых механизмов действия различных стрессовых факторов на пыльники растений, особенно во время их критических стадий развития. В пользу этого предположения свидетельствуют и данные по стрессовой реакции пыльников *Arabidopsis thaliana* на стадии мейоза в ответ на действие температур выше пороговых: методом флуоресцентной гибридизации *in situ* в микроспороцитах этого растения также выявлены нарушения и расхож-

дения хромосом, и цитокинеза (Lei et al., 2020), как это установлено для микроспороцитов риса (Endo et al., 2009) и пшеницы (Omid et al., 2014).

Однако для окончательного вывода об общности механизмов воздействия различных стрессовых факторов на пыльники растений во время их критических стадий развития требуются дополнительные сведения.

Для злаков достаточно убедительно показана еще одна критическая стадия развития пыльника, которая соответствует митозу микроспор. Выявлено, что стрессовая обработка *in situ* высокой температурой пыльников риса, содержащих митотически делящиеся микроспоры, приводила к снижению жизнеспособности пыльцы и/или нарушению ее способности прорасти на рыльце (Das et al., 2014; Khlaimongkhon et al., 2021). Для этого же злака приводятся сведения об индуцированных высокотемпературным стрессом аномалиях не только митоза микроспор, но и тканей стенки гнезда пыльника: утолщение оболочек клеток экзотеция, неравномерное распределение телец Убиша в клетках тапетума (Hu et al., 2021); и в этом можно видеть отражение нарушений структуры всего пыльника как системы.

По отношению к пыльникам ряда злаков показана их особая уязвимость на стадии митоза микроспор к дефициту воды, коррелирующему с засухой (Yu et al., 2019).

Важно обратить внимание на то, что критичность пыльника на стадии, соответствующей микроспоре, отмечена и у мужско-стерильного мутанта риса *paal* (*post-meiosis abnormal anther 1*) без внешнего стрессового воздействия, при этом выявлены как аномалии формирующейся экзины оболочки микроспор, так и дегенерация клеток тапетума (Lei et al., 2022).

Подтверждения критической стадии развития пыльника злаков, соответствующей стадии микроспоры, можно видеть и в результатах экспериментальных исследований биологического феномена андрогенеза *in vitro* (в другой терминологии — андроклинии), состоящего в переключении программы развития микроспоры с обычного гаметофитного пути, приводящего к образованию зрелого пыльцевого зерна, на индуцированный стрессом *in situ* (в том числе высокотемпературным) спорофитный путь, ведущий к формированию растения-регенеранта в условиях *in vitro* и *ex vitro* (Круглова, 2019; Bednarek et al., 2021; Kanbar et al., 2021). Исследования в этой области посвящены не только оценке на этой стадии стрессового воздействия высоких температур на пыльники злаков, но и анализу структуры микроспоры, которую предложено относить к ствольным клеткам (Батыгина, 2014). Так, для пшеницы установлено, что высокотемпературный режим воздействия *in situ* (32–34°C в течение четырех суток) на пыльники индуциру-

ет спорофитный морфогенез микроспоры (Дьячук и др., 2019). Такое воздействие вызывает индукцию синтеза белков теплового шока, которые, действуя как молекулярные шапероны, блокируют программу гаметофитной дифференциации микроспоры (Vednarek et al., 2021) и, по-видимому, создают возможность реализации спорофитной дифференциации микроспоры как стволовой клетки. Морфогенетическая компетентность к переключению развития на спорофитный путь морфогенеза определяется структурной организацией микроспоры, главным образом наличием крупной центральной вакуоли, что, по-видимому, и определяет ее повышенную чувствительность к стрессовому воздействию; кроме того, температурный стресс индуцирует отхождение микроспор от стенки пыльника, нарушая тем самым общую интегрированность структуры пыльника (Батыгина и др., 2010; Круглова, 2019).

Таким образом, можно полагать, что в результате выполненных экспериментов достаточно достоверно выявлены две критические стадии развития системы пыльника злаков, во время которых эти генеративные структуры особенно чувствительны к экспериментальному действию *in situ* высокой температуры воздуха. Эти стадии соответствуют стадиям мейоза микроспороцитов и митоза микроспор. Такие результаты вполне ожидаемы, поскольку негативное воздействие различных абиотических стрессов на процессы мейоза и митоза установлено для многих растений (Fuchs et al., 2018). По-видимому, можно обнаружить и другие критические стадии развития пыльника злаков, исходя из критерия повышенной чувствительности к воздействию стрессового фактора высокой температуры воздуха *in situ*. Однако в этом отношении другие стадии морфогенеза пыльника злаков изучены в значительно меньшей степени, исследования посвящены главным образом аномалиям в прорастании зрелых пыльцевых зерен (Coast et al., 2016; Zhang et al., 2018; Fábíán et al., 2019; Fedotova et al., 2020), то есть без учета состояния тканей стенки гнезда пыльника.

В целом следует отметить, что степень изученности и пыльника злаков как интегрированной системы тканей, и критических стадий развития этой системы в экспериментальных условиях повышенных температур воздуха *in situ* сравнительно невелика. В то же время как системная оценка пыльника, так и выявление критических стадий морфогенеза этой генеративной структуры могут служить методологическим подходом не только при выявлении жароустойчивых генотипов, но и в понимании механизмов ответных реакций клеток и тканей растений на различные стрессовые воздействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема устойчивости культурных растений к абиотическому стрессовому фактору физиологической засухи, вызванной действием высоких температур воздуха, привлекает большое внимание исследователей всего мира, что неудивительно в условиях прогнозируемой аридизации климата.

Жароустойчивость растений – сложный процесс, определяемый многими генетическими и эпигенетическими факторами. Для выявления генотипов культурных растений в селекционных целях создания жароустойчивых высокопродуктивных сортов необходимы разработка и привлечение различных подходов. Так, для хлебных злаков предложены следующие подходы, рассматриваемые в данном обзоре как методологические: а) моделирование воздействия стрессового фактора повышенных температур воздуха в экспериментальных условиях *in situ* (климатические камеры, фитотроны, теплицы); б) использование в модельных экспериментах *in situ* пыльников как генеративных структур, наиболее чувствительных к действию повышенных температур воздуха, в том числе пыльников жароустойчивых и жарочувствительных сортов, то есть контрастных по отношению к изучаемому стрессовому фактору. Такие методологические подходы получили достаточное обоснование в современных исследованиях хлебных злаков. В литературе представлено значительное количество работ, посвященных использованию пыльников пшеницы, кукурузы и особенно риса в экспериментальной оценке действия высоких температур воздуха в условиях *in situ*.

Весьма перспективным в этой области, на наш взгляд, является привлечение разработанного с позиции описательной и экспериментальной эмбриологии растений методологического подхода, состоящего в использовании взаимосвязанных концепций: оценка пыльника как сложной интегрированной системы тканей и наличие критических стадий в развитии этой системы (Батыгина, 2014). Эти концепции получили экспериментальное подтверждение. В то же время критический анализ обширных литературных данных, полученных на примере хлебных злаков, свидетельствует о том, что большинство исследователей при изучении стрессовых реакций пыльников в модельных экспериментальных условиях высокотемпературного воздействия *in situ* анализируют только развитие пыльцевых зерен, не принимая во внимание состояние тканей стенки гнезда пыльника, взаимодействие их как друг с другом, так и с развивающимися пыльцевыми зернами. Иначе говоря, эти генеративные структуры, как правило, не рассматриваются экспериментаторами как сложные интегрированные системы при оценке воздействия на них абиотического высокотемпературного стрессового фактора. Морфо-

генез пыльника представляет собой сложный динамичный процесс, протекающий в достаточно короткие сроки, что осложняет использование этого методологического подхода. Но, тем не менее, необходима его дальнейшая разработка, а также его активное применение в выявлении жароустойчивых генотипов и не только по отношению к злакам.

Важно подчеркнуть, что рассмотренные в статье экспериментальные исследования пыльников хлебных злаков сосредоточены на изучении воздействия единичного абиотического стресса засухи, вызванного повышенной температурой воздуха, тогда как в полевых условиях одновременно действует множество стрессов и их комбинаций. Проанализированные методологические подходы могут способствовать пониманию механизмов влияния множественных стрессовых факторов на развитие пыльников и выявлению возможных ключевых генов или генных сетей комплексной стрессовой устойчивости.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена по теме № АААА-А18-118022190099-6 в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ № 075-00326-19-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При подготовке данной статьи участие людей и использование животных в качестве объектов исследований не рассматривалось.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алабушев А.В., Ионова Е.В., Лиховидова В.А., Газе В.Л.* Оценка засухоустойчивости озимой мягкой пшеницы в условиях модельной засухи // Земледелие. 2019. № 7. С. 35–37.
- Батыгина Т.Б.* Биология развития растений. Симфония жизни. СПб.: ДЕАН, 2014. 764 с.
- Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю. и др.* От микроспоры – к сорту / Ред. В.А. Вахитов. М.: Наука, 2010. 174 с.
- Драгавцев В.А.* Решения технологических задач селекционного повышения урожаев, вытекающие из теории эколого-генетической организации количественных признаков // Бюл. ГНБС. 2019. № 132. С. 17–28.
- Дубровная О.В.* Селекция *in vitro* пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессовым факторам // Физиол. раст. генет. 2017. Т. 49. № 4. С. 279–292.
- Дьячук Т.И., Хомякова О.В., Акинина В.Н. и др.* Микроспоровый эмбриогенез *in vitro* – роль стрессов // Вавилов. журн. генет. селекц. 2019. Т. 23. № 1. С. 86–94.
- Зинатуллина А.Е.* Модельная система “зародыш–зародышевый каллус” в экспресс-оценке стрессовых и антистрессовых воздействий (на примере злаков) // Экобиотех. 2020. Т. 3. № 1. С. 38–50.
- Камелина О.П.* Систематическая эмбриология цветковых растений. Т. 1. Двудольные. Барнаул: АРТИКА, 2009. 501 с.
- Круглова Н.Н.* Инновационная биотехнология андроклиной гаплоидии пшеницы на основе комплекса эмбриологических и цитофизиологических данных // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 3. С. 234–245.
- Круглова Н.Н.* Системный подход к морфогенезу пыльника цветковых растений // Бюл. ГНБС. 2022а. Вып. 145. В печати.
- Круглова Н.Н.* Экспериментальное выявление засухоустойчивых генотипов хлебных злаков на основе использования пыльников как интегрированных систем: постановка проблемы // Таврич. вест. агр. науки. 2022б. № 4 (32). С. 106–121.
- Круглова Н.Н., Зинатуллина А.Е.* Системный подход к органогенезу пыльника *in vivo* как методологическая основа экспериментальных исследований *in vitro* (на примере злаковых и бобовых) // Экобиотех. 2018. Т. 1. № 3. С. 143–160.
- Круглова Н.Н., Зинатуллина А.Е.* Культура *in vitro* автономных зародышей как модельная система для исследования стресс-устойчивости растений к абиотическим факторам (на примере злаков) // Успехи соврем. биол. 2021. Т. 141. № 5. С. 483–495.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е.* Каллус *in vitro* как модельная система для исследования стрессоустойчивости растений к абиотическим факторам (на примере злаков) // Успехи соврем. биол. 2018. Т. 138. № 3. С. 283–293.
- Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. и др.* Зародыш цветковых растений в критическую стадию относительной автономности эмбриогенеза (на примере злаков) // Онтогенез. 2020. Т. 51. № 1. С. 3–18.
- Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Зинатуллина А.Е.* Критические стадии эмбриогенеза злаков: теоретическое и практическое значение // Онтогенез. 2022. Т. 53. № 6. С. 437–453.
- Пикало С., Демидов О., Юрченко Т. и др.* Методи оцінки посухостійкості селекційного матеріалу пшениці // Вісн. Львівськ. ун-ту. Сер. біол. 2020. Вип. 82. С. 63–79.
- Светлов П.Г.* Теория критических периодов развития и ее значение для понимания принципов действия среды на онтогенез // Вопросы цитологии и общей физиологии / Ред. Ю.И. Полянский. М., Л.: АН СССР, 1960. С. 263–285.
- Шаманин В.П., Трущенко А.Ю., Пинкаль А.В. и др.* Проблема засухоустойчивости яровой мягкой пшеницы в Западной Сибири и современные экспресс-методы ее оценки в полевых условиях // Вест. НГАУ. 2016. № 3 (40). С. 57–64.
- Abdolshahi R., Nazari M., Safarian A. et al.* Integrated selection criteria for drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programs using discriminant analysis // Field Crops Res. 2015. V. 174. P. 20–29.

- Ali N., Akmal M. Wheat growth, yield, and quality under water deficit and reduced nitrogen supply. A review // Ges. Pflanzen. 2022. V. 74. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1007/s10343-021-00615-w>
- Åstrand J., Knight C., Robson J. et al. Evolution and diversity of the angiosperm anther: trends in function and development // Plant Reprod. 2021. V. 34. P. 307–319.
<https://doi.org/10.1007/s00497-021-00416-1>
- Baillo E.H., Kimotho R.N., Zhang Z., Xu P. Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement // Genes. 2019. V. 10. P. 771.
<https://doi.org/10.3390/genes10100771>
- Basu S., Ramegowda V., Kumar A., Pereira A. Plant adaptation to drought stress // F1000Research. 2016. V. 5. P. 1554.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.7678.1>
- Bednarek P.T., Pachota K.A., Dynkowska W.M. et al. Understanding *in vitro* tissue culture-induced variation phenomenon in microspore system // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 7546.
<https://doi.org/10.3390/ijms22147546>
- Bélander S., Pokhler S., Czymmek K., Meyers B.C. Pre-meiotic, 24-nucleotide reproductive phasiRNAs are abundant in anthers of wheat and barley but not rice and maize // Plant Physiol. 2020. V. 184. P. 1407–1423.
- Begcy K., Nosenko T., Zhou L.Z. et al. Male sterility in maize after transient heat stress during the tetrad stage of pollen development // Plant Physiol. 2019. V. 181. P. 683–700.
- Bheemanahalli R., Impa S.M., Krassovskaya I. et al. Enhanced N-metabolites, ABA and IAA-conjugate in anthers instigate heat sensitivity in spring wheat // Physiol. Plant. 2020. V. 169. P. 501–514.
- Bokshi A.I., Tan D., Thistlethwaite R.J. et al. Impact of elevated CO₂ and heat stress on wheat pollen viability and grain production // Funct. Plant Biol. 2021. V. 48. P. 503–514.
- Brás T.A., Seixas J., Carvalhais N., Jägermeyr J. Severity of drought and heatwave crop losses tripled over the last five decades in Europe // Environ. Res. Lett. 2021. V. 16. P. 065012.
<https://doi.org/10.1088/1748-9326/abf004>
- Browne R.G., Iacuone S., Li S.F. et al. Anther morphological development and stage determination in *Triticum aestivum* // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. P. 228.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00228>
- Browne R.G., Li S.F., Iacuone S. et al. Differential responses of anthers of stress tolerant and sensitive wheat cultivars to high temperature stress // Planta. 2021. V. 254. P. 4.
<https://doi.org/10.1007/s00425-021-03656-7>
- Chaturvedi P., Wiese A.J., Ghatak A. et al. Heat stress response mechanisms in pollen development // New Phytol. 2021. V. 231. P. 571–585.
<https://doi.org/10.1111/nph.17380>
- Chen Z., Galli M., Gallavotti A. Mechanisms of temperature-regulated growth and thermotolerance in crop species // Curr. Opin. Plant Biol. 2022. V. 65. P. 102134.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102134>
- Chowdhury M.K., Hasan M.A., Bahadur M.M. et al. Evaluation of drought tolerance of some wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes through phenology, growth, and physiological indices // Agronomy. 2021. V. 11. P. 1792.
<https://doi.org/10.3390/agronomy11091792>
- Climate change and food security with emphasis on wheat / Eds M. Ozturk, A. Cul. L.: Acad. Press, 2020. 370 p.
- Coast O., Murdoch A.J., Ellis R.H. et al. Resilience of rice (*Oryza* spp.) pollen germination and tube growth to temperature stress // Plant Cell Environ. 2016. V. 39. P. 26–37.
- Da Costa M.V.J., Ramegowda V., Sreeman S., Nataraja K.N. Targeted phytohormone profiling identifies potential regulators of spikelet sterility in rice under combined drought and heat stress // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 11690.
<https://doi.org/10.3390/ijms222111690>
- Das S., Krishnan P., Nayak M., Ramakrishnan B. High temperature stress effects on pollens of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes // Environ. Exp. Bot. 2014. V. 101. P. 36–46.
- Demydov O., Khomenko S., Fedorenko M. et al. Stability and plasticity of collection samples of durum spring wheat in the forest-steppe conditions of Ukraine // Am. J. Agr. Forest. 2021. V. 9. P. 83–88.
- Draeger T., Moore G. Short periods of high temperature during meiosis prevent normal meiotic progression and reduce grain number in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2017. V. 130. P. 1785–1800.
- El-Mowafi H.F., Alkahtani M.D.F., Abdallah R.M. et al. Combining ability and gene action for yield characteristics in novel aromatic cytoplasmic male sterile hybrid rice under water-stress conditions // Agriculture. 2021. V. 11. P. 226.
<https://doi.org/10.3390/agriculture11030226>
- Endo M., Tsuchiya T., Hamada K. et al. High temperatures cause male sterility in rice plants with transcriptional alterations during pollen development // Plant Cell Physiol. 2009. V. 50. P. 1911–1922.
- Fabián A., Sáfrán E., Szabó-Eitel G. et al. Stigma functionality and fertility are reduced by heat and drought co-stress in wheat // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. P. 244.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00244>
- Fedotova O.A., Polyakova E.A., Grabelnykh O.I. Influence of high temperatures on heat tolerance and synthesis of heat shock proteins in spring wheat at the initial stages of development // Sib. J. Life Sci. Agricul. 2020. V. 12. P. 179–191.
- Feng B., Zhang C., Chen T. et al. Salicylic acid reverses pollen abortion of rice by heat stress // BMC Plant Biol. 2018. V. 18. P. 245.
<https://doi.org/10.1186/s12870-018-1472-5>
- Fernández-Gómez J., Talle B., Tidy A.C., Wilson Z.A. Accurate staging of reproduction development in Cadenza wheat by non-destructive spike analysis // J. Exp. Bot. 2020. V. 71. P. 3475–3484.
- Fuchs L.K., Jenkins G., Phillips D.W. Anthropogenic impacts on meiosis in plants // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. P. 1429.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01429>
- Gahlaut V., Jaiswal V., Kumar A., Gupta P.K. Transcription factors involved in drought tolerance and their possible role in developing drought tolerant cultivars with emphasis on wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2016. V. 129. P. 2019–2042.
- González-Schain N., Dreni L., Lawas L.M. et al. Genome-wide transcriptome analysis during anthesis reveals new insights into the molecular basis of heat stress responses

- in tolerant and sensitive rice varieties // *Plant Cell Physiol.* 2016. V. 57. P. 57–68.
- González-Schain N., Roig-Villanova I., Kater M.M. Early cold stress responses in post-meiotic anthers from tolerant and sensitive rice cultivars // *Rice.* 2019. V. 12. P. 94. <https://doi.org/10.1186/s12284-019-0350-6>
- Guo J., Gu X., Lu W., Lu D. Multiomics analysis of kernel development in response to short-term heat stress at the grain formation stage in waxy maize // *J. Exp. Bot.* 2021. V. 72. P. 6291–6304.
- Guo X., Li L., Liu X. et al. MYB2 is important for tapetal PCD and pollen development by directly activating protease expression in *Arabidopsis* // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 3563. <https://doi.org/10.3390/ijms23073563>
- Gyawali A., Upadhyaya K., Panthi B. et al. Heat stress effect on wheat: a review // *i TECH MAG.* 2021. V. 3. P. 5–8. <https://doi.org/10.26480/itechmag.03.2021.05.08>
- Hu Q., Wang W., Lu Q. et al. Abnormal anther development leads to lower spikelet fertility in rice (*Oryza sativa* L.) under high temperature during the panicle initiation stage // *BMC Plant Biol.* 2021. V. 21. P. 428. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03209-w>
- Huang J., Zhang T., Linstroth L. et al. Control of anther cell differentiation by the small protein ligand TPD1 and its receptor EMS1 in *Arabidopsis* // *PLoS Genet.* 2016. V. 12. P. e1006147. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006147>
- Hussain J., Khaliq T., Ahmad A. et al. Wheat responses to climate change and its adaptations: a focus on arid and semi-arid environment // *Int. J. Environ. Res.* 2018. V. 12. P. 117–126. <https://doi.org/10.1007/s41742-018-0074-2>
- Jagadish S. Heat stress during flowering in cereals – effects and adaptation strategies // *New Phytol.* 2020. V. 226. P. 1567–1572.
- Jagadish S., Way D., Sharkey T. Scaling plant responses to high temperature from cell to ecosystem // *Plant Cell Environ.* 2021. V. 44. № 7. P. 1987–1991.
- Jogawat A., Yadav B., Lakra N. et al. Crosstalk between phytohormones and secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: a review // *Physiol. Plant.* 2021. V. 172. P. 1106–1132. <https://doi.org/10.1111/ppl.13328>
- Kanbar O.Z., Lantos C., Pauk J. *In vitro* anther culture as efficiently applied technique for doubled haploid production of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Ratar. Povrtar.* 2021. V. 58. P. 31–45.
- Kandel S. Wheat responses, defense mechanisms and tolerance to drought stress: a review article // *Int. J. Res. Appl. Sci. Biotechnol.* 2021. V. 8. Iss. 5. P. 99–109. <https://doi.org/10.31033/ijrasb.8.5.14>
- Khan A., Ahmad M., Ahmed M., Hussain I.M. Rising atmospheric temperature impact on wheat and thermotolerance strategies // *Plants.* 2020. V. 10. P. 43. <https://doi.org/10.3390/plants10010043>
- Khan R.M., Yu P., Sun L. et al. DCET1 controls male sterility through callose regulation, exine formation and tapetal programmed cell death in rice // *Front. Genet.* 2021. V. 12. P. 790789. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.790789>
- Khan S., Anwar S., Yu M. et al. Development of drought-tolerant transgenic wheat: achievements and limitations // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 3350. <https://doi.org/10.3390/ijms20133350>
- Khlaïmongkhon S., Chakhonkaen S., Tongmark K. et al. RNA sequencing reveals rice genes involved in male reproductive development under temperature alteration // *Plants.* 2021. V. 10. P. 663. <https://doi.org/10.3390/plants10040663>
- Kimotho R.N., Baillo E.H., Zhang Z. Transcription factors involved in abiotic stress responses in maize (*Zea mays* L.) and their roles in enhanced productivity in the post genomics era // *PeerJ.* 2019. V. 7. P. e7211. <https://doi.org/10.7717/peerj.7211>
- Kruglova N.N., Zinatullina A.E. *In vitro* culture of autonomous embryos as a model system for the study of plant stress tolerance to abiotic factors (on the example of cereals) // *Biol. Bull. Rev.* 2022. V. 12. P. 201–211.
- Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E. *In vitro* callus as a model system for the study of plant stress-resistance to abiotic factors (on the example of cereals) // *Biol. Bull. Rev.* 2018. V. 8. P. 518–526.
- Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E. Embryo of flowering plants at the critical stage of embryogenesis relative autonomy // *Russ. J. Dev. Biol.* 2020. V. 51. P. 1–15.
- Kumar S., Thakur M., Mitra R. et al. Sugar metabolism during pre- and post-fertilization events in plants under high temperature stress // *Plant Cell Rep.* 2022. V. 41. P. 655–673.
- Lamers J., van der Meer T., Testerink C. How plants sense and respond to stressful environments // *Plant Physiol.* 2020. V. 182. P. 1624–1635.
- Langridge P., Reynolds M. Breeding for drought and heat tolerance in wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2021. V. 134. P. 1753–1769.
- Lawas L.M.F., Erban A., Kopka J. et al. Metabolic responses of rice source and sink organs during recovery from combined drought and heat stress in the field // *Giga-science.* 2019. V. 8. P. giz102. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz102>
- Laza H.E., Kaur-Kapoor H., Xin Z. et al. Morphological analysis and stage determination of anther development in Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) // *Planta.* 2022. V. 255. P. 86. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03853-y>
- Lei T., Zhang L., Feng P. et al. OsMYB103 is essential for tapetum degradation in rice // *Theor. Appl. Genet.* 2022. V. 135. P. 929–945.
- Lei X., Ning Y., Elesawi I.E. et al. Heat stress interferes with chromosome segregation and cytokinesis during male meiosis in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Signal. Behav.* 2020. V. 15. P. 1746985. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1746985>
- Leng P., Zhao J. Transcription factors as molecular switches to regulate drought adaptation in maize // *Theor. Appl. Genet.* 2020. V. 133. P. 1455–1465. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03494-y>
- Li L., Zheng Z., Biederman J.A. et al. Drought and heat wave impacts on grassland carbon cycling across hierarchical levels // *Plant Cell Environ.* 2020. V. 44. P. 2402–2413.

- Li X., Lawas L.M.F., Malo R. et al.* Metabolic and transcriptomic signatures of rice floral organs reveal sugar starvation as a factor in reproductive failure under heat and drought stress // *Plant Cell Environ.* 2015. V. 38. P. 2171–2192.
- Liu J., Zhou Y., Wang L. et al.* Cytological analysis and fine mapping of *paal* (post-meiosis abnormal anther 1) mutant with abnormal tapetum and microspore development // *Biochem. Genet.* 2022. V. 60. P. 2268–2285. <https://doi.org/10.1007/s10528-022-10217-4>
- Liu Y., Liu X., Wang X. et al.* Heterologous expression of heat stress-responsive *AtPLC9* confers heat tolerance in transgenic rice // *BMC Plant Biol.* 2020. V. 20. P. 514. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02709-5>
- Liu Z., Qin J., Tian X. et al.* Global profiling of alternative splicing landscape responsive to drought, heat and their combination in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Plant Biotechnol. J.* 2018. V. 16. P. 714–726.
- Lohani N., Singh M.B., Bhalla P.L.* High temperature susceptibility of sexual reproduction in crop plants // *J. Exp. Bot.* 2020. V. 71. P. 555–568.
- Lv S., Feng K., Peng S. et al.* Comparative analysis of the transcriptional response of tolerant and sensitive wheat genotypes to drought stress in field condition // *Agronomy.* 2018. V. 8. P. 247. <https://doi.org/10.3390/agronomy8110247>
- Maleki M., Ghorbanpour M., Nikabadi S., Wani S.H.* *In vitro* screening of crop plants for abiotic stress tolerance // *Recent approaches in omics for plant resilience to climate change* / Ed. S. Wani. Cham: Springer, 2019. P. 75–91.
- Marone D., Mastrangelo A.M., Borelli G.M. et al.* Specialized metabolites: physiological and biochemical role in stress resistance, strategies to improve their accumulation, and new applications in crop breeding and management // *Plant Physiol. Biochem.* 2022. V. 172. P. 48–55.
- Matsui T., Hasegawa T.* Effect of long anther dehiscence on seed set at high temperature during flowering in rice (*Oryza sativa* L.) // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 20363. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56792-2>
- Matsui T., Kobayashi K., Kagata H., Horie T.* Correlation between viability of pollination and length of basal dehiscence of the theca in rice under a hot-and-humid condition // *Plant Prod. Sci.* 2005. V. 8. P. 109–114.
- Mesihovic A., Iannaccone R., Firon N., Fragkostefanakis S.* Heat stress regimes for the investigation of pollen thermotolerance in crop plants // *Plant Reprod.* 2016. V. 29. P. 93–105.
- Omidi M., Siahpoosh M.R., Mamghani R., Modarresi M.* The influence of terminal heat stress on meiosis abnormalities in pollen mother cells of wheat // *Cytologia.* 2014. V. 79. P. 49–58.
- Pan X., Yan W., Chang Z. et al.* *OsMYB80* regulates anther development and pollen fertility by targeting multiple biological pathways // *Plant Cell Physiol.* 2020. V. 61. P. 988–1004.
- Plant life under changing environment: responses and management / Eds D.K. Tripathi, V.P.P. Singh, D.K. Chauhan et al. L.: Acad. Press, 2020. 1020 p.
- Prasad P.V., Bheemanahalli R., Jagadish S.K.* Field crops and the fear of heat stress – opportunities, challenges and future directions // *Field Crops Res.* 2017. V. 200. P. 114–121.
- Qaseem M.F., Qureshi R., Muqaddasi Q.H. et al.* Genome-wide association mapping in bread wheat subjected to independent and combined high temperature and drought stress // *PLoS One.* 2018. V. 13. P. e0199121. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199121>
- Ranjan R., Malik N., Sharma S. et al.* *OsCPK29* interacts with *MADS68* to regulate pollen development in rice // *Plant Sci.* 2022. V. 321. P. 111297. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111297>
- Raveena, Bharti R., Chaudhary N.* Drought resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.): a review // *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2019. V. 8. P. 1780–1792.
- Raza Q., Riaz A., Bashir K., Sabar M.* Reproductive tissues-specific meta-QTLs and candidate genes for development of heat-tolerant rice cultivars // *Plant Mol. Biol.* 2020. V. 104. P. 97–112.
- Sakkar T., Thankappan R., Mishra G.P., Nawade B.D.* Advances in the development and use of *DREB* for improved abiotic stress tolerance in transgenic crop plants // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2019. V. 25. P. 1323–1334.
- Sallam A., Alqudah A.M., Dawood M.F. et al.* Drought stress tolerance in wheat and barley: advances in physiology, breeding and genetics research // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 3137. <https://doi.org/10.3390/ijms20133137>
- Sattar S., Afzal R., Bashir I. et al.* Biochemical, molecular and morpho-physiological attributes of wheat to upgrade grain production and compete with water stress // *Int. J. Innov. Appr. Agricult. Res.* 2019. V. 3. P. 510–528.
- Schindfessel C., Drozdowska Z., De Mooij L., Geelen D.* Loss of obligate crossovers, defective cytokinesis and male sterility in barley caused by short-term heat stress // *Plant Reprod.* 2021. V. 34. P. 243–253.
- Severtsova E.A., Severtsov A.S.* Crucial stages of embryogenesis of *R. arvalis*. Part 1. Linear measurements of embryonic structures // *Russ. J. Dev. Biol.* 2011. V. 42. P. 331–341.
- Severtsova E.A., Severtsov A.S.* Crucial stages of embryogenesis of *R. arvalis*. Part 2. Development of head structures // *Russ. J. Dev. Biol.* 2012. V. 43. P. 164–171.
- Severtsova E.A., Severtsov A.S.* Crucial stages of embryogenesis of *R. arvalis*. Part 3. Modularity of developmental integrity // *Russ. J. Dev. Biol.* 2013. V. 44. P. 273–278.
- Sinha R., Fritschi F.B., Zandalinas S.I., Mittler R.* The impact of stress combination on reproductive process in crops // *Plant Sci.* 2021. V. 311. P. 111007. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111007>
- Sun S., Wang D., Li J. et al.* Transcriptome analysis reveals photoperiod-associated genes expressed in rice anthers // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 621561. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.621561>
- Sun Y., Wang X., Chen Z. et al.* Quantitative proteomics and transcriptomics reveals differences in proteins during anthers development in *Oryza longistaminata* // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 744792. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.744792>
- Tang H., Song Y., Guo J. et al.* Physiological and metabolome changes during anther development in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Plant Physiol. Biochem.* 2018. V. 132. P. 18–32.

- Ullah A., Nadeem F., Nawaz A. *et al.* Heat stress effects on the reproductive physiology and yield of wheat // *J. Agronom. Crop Sci.* 2022. V. 208. P. 1–17.
- van Es S.W. Too hot to handle, the adverse effect of heat stress on crop yield // *Physiol. Plant.* 2020. V. 169. P. 499–500.
- Wada H., Hatakeyama Y., Nakashima T. *et al.* On-site single pollen metabolomics reveals varietal differences in phosphatidylinositol synthesis under heat stress conditions in rice // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 2013. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58869-9>
- Wu C., Cui K., Li Q. *et al.* Estimating the yield stability of heat-tolerant rice genotypes under various heat conditions across reproductive stages: a 5-year case study // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. P. 13604. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93079-x>
- Wu L., Jing X., Zhang B. *et al.* A natural allele of *OsMS1* responds to temperature changes and confers thermosensitive genic male sterility // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. P. 2055. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29648-z>
- Yadav S., Sharma K.D. Molecular and morphophysiological analysis of drought stress in plants // *Plant growth.* Ch. 10 / Ed. E.C. Rigobelo. Rijeka: IntechOpen, 2016. P. 149. <https://doi.org/10.5772/65246>
- Yadav A.K., Carroll A.J., Estavillo G.M. *et al.* Wheat drought tolerance in the field is predicted by amino acid responses to glasshouse-imposed drought // *J. Exp. Bot.* 2019. V. 70. P. 4931–4948.
- Yadav B., Jogawat A., Rahman M.S., Narayan O.P. Secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: a review // *Gene Rep.* 2021. V. 23. P. 101040. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101040>
- Yu J., Jiang M., Guo C. Crop pollen development under drought: from the phenotype to the mechanism // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 1550. <https://doi.org/10.3390/ijms20071550>
- Zahoor I., Hasan H., Gul A. *et al.* Molecular mechanism of drought tolerance in wheat // *Climate change and food security with emphasis on wheat* / Eds M. Ozturk, A. Gul. L.: Acad. Press, 2020. P. 129–154.
- Zhan X., Chen Z., Chen R., Shen C. Environmental and genetic factors involved in plant protection-associated secondary metabolite biosynthesis pathways // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. P. 877304. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.877304>
- Zhang D., Luo X., Zhu L. Cytological analysis and genetic control of rice anther development // *J. Genet. Genom.* 2011. V. 38. P. 379–390.
- Zhang C., Li G., Chen T. *et al.* Heat stress induces spikelet sterility in rice at anthesis through inhibition of pollen tube elongation interfering with auxin homeostasis in pollinated pistil // *Rice.* 2018. V. 11. P. 14. <https://doi.org/10.1186/s12284-018-0206-5>
- Zhang Z., Hu M., Xu W. *et al.* Understanding the molecular mechanism of anther development under abiotic stresses // *Plant Mol. Biol.* 2021. V. 105. P. 1–10.

Some Methodological Approaches to the Identification of Heat Resistant Genotypes of Cultivated Plants (on the Example of Cereals)

N. N. Kruglova^a, * and A. E. Zinatullina^a

^a*Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia*

**e-mail: kruglova@anrb.ru*

The problem of cultivated plants resistance to heat as the effect of high air temperatures leading to physiological drought is extremely relevant not only in the conditions of predicted climate aridization, but also when studying the effects of relatively short-term “heat waves”. Modern breeding is focused on the creation of high-yielding heat-resistant varieties of cultivated plants, especially cereals as the main world food resource. During breeding developments, it is necessary to first identify heat-resistant cereal genotypes for their insertion in the appropriate programs. The article provides a critical analysis of a number of approaches presented in the literature to identify such genotypes (modeling of the effect of the high temperature stress factor in experimental conditions *in situ*; the use of anthers in such conditions as the generative structures more sensitive to the effects of this stress factor in comparison with vegetative organs), which can be assessed as methodological. In addition, from the standpoint of descriptive and experimental plant embryology, the use of inter-related concepts (developed by T.B. Batygina, 2014 and earlier) is proposed as the promising methodological approach: the assessment of the anther as the complex integrated tissue system and the presence of critical stages in the development of this system.

Keywords: abiotic stresses, heat, physiological drought, heat modeling, anther as integrated system, critical stages of anther development, cereals

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

DOI: 10.31857/S0042132423020126, EDN: PIYNFM

Журнал “Успехи современной биологии” публикует обзорные и теоретические статьи, отражающие современные достижения биологии, а также принципиально важные экспериментальные работы с соответствующим теоретическим обсуждением. В случае, если статья подготовлена в форме нескольких сообщений, они должны быть представлены одновременно. Статьи, отклоненные редколлегией, к повторному рассмотрению как правило не принимаются.

Отправляя рукопись в журнал, автор гарантирует, что соответствующий материал (в оригинале или переводе на другие языки или с других языков) ранее нигде не публиковался и не находится на рассмотрении для публикации в других издательствах.

Редакция журнала просит авторов при направлении статей в печать руководствоваться изложенными ниже правилами, а также по возможности использовать стилевой файл, помещенный на сайте www.pleiadesonline.com. Стилевой файл создан для упрощения работы авторов по подготовке рукописей к публикации. Он предоставляет возможность одним нажатием кнопки на панели инструментов изменить весь комплекс стилей для выбранного фрагмента в соответствии со стандартами по предоставлению рукописей.

Редакция журнала принимает рукописи через авторский портал редакционно-издательской системы издательства Pleiades Publishing. Сведения о прохождении рукописи, рецензирование, согласование авторской правки осуществляются через личный кабинет автора после регистрации на сайте системы: <https://publish.sciencejournals.ru>.

Редакционная коллегия журнала “Успехи современной биологии” при рассмотрении статьи проводит проверку материала с помощью системы Антиплагиат. В случае обнаружения многочисленных заимствований редакция действует в соответствии с правилами COPE.

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ РУКОПИСИ

Статья должна быть напечатана однотипно 12 кеглем через 1.5 интервала (таблицы тоже) на одной стороне листа формата А4, с полями не менее 3 см со всех сторон. При наборе используйте

стандартные Windows TrueType шрифты (Times New Roman – для текста, Symbol – для греческих букв, MathematicalPi2 – для рукописных и готических символов). Общий объем рукописи (включая аннотацию, литературу, таблицы, и подписи к рисункам) не должен превышать 35 страниц. Число рисунков не должно быть более семи.

К рукописи должна быть приложена “Страничка для переводчика”: резюме на английском языке, название статьи, общепринятое название учреждения, где выполнена работа, транслитерация фамилий авторов, перевод ключевых терминов, обозначений, сокращений и единиц измерений.

На отдельной странице следует привести ФИО всех авторов полностью, места работы, номера телефонов (мобильный и рабочий), адрес электронной почты и скайп-имя для связи с редактором.

В сопроводительном письме редколлегия журнала просит авторов назвать 3–5 возможных рецензентов указанной работы (при возможности указать электронные адреса).

Обращаем Ваше внимание, что новые статьи редакция принимает только в формате **doc**. Файлы рукописей, подписанных договоров и сопроводительных писем должны быть собраны в один архив (желательно ZIP). Бумажный вариант предоставлять не нужно!

Статья, поступающая для публикации, должна сопровождаться: направлением от учреждения, в котором выполнена работа; лицензионным договором между автором и главным редактором журнала (образец договора см. на сайте <http://sciencejournals.ru/journal/uspbio/>).

СТРУКТУРА РУКОПИСИ

УДК – индекс Универсальной десятичной классификации (**курсивом** в левом верхнем углу);

– название статьи;

– инициалы, затем фамилии авторов;

– полное название учреждения (аббревиатура не допускается), город, адрес электронной почты (**курсивом**);

– аннотация (поместить после шапки статьи); из аннотации должно быть ясно, какие проблемы рассматриваются в статье, какие вопросы в ней обсуждаются;

– ключевые слова (3–6 слов или коротких словосочетаний), точно отражающие содержание статьи и не повторяющие название.

Отметить арабскими цифрами соответствие фамилий авторов учреждениям, в которых они работают; звездочкой помечается фамилия автора, ответственного за корреспонденцию.

Статья должна включать следующие рубрики: ВВЕДЕНИЕ, ЗАКЛЮЧЕНИЕ, БЛАГОДАРНОСТИ (общая информация о любой помощи в проведении работы и подготовке статьи: сообщения о полезных обсуждениях и дискуссиях, благодарности коллегам и рецензентам (в особых случаях); сообщения о предоставлении материалов, научных данных, компьютерного оборудования, приборов – во временное пользование; информация о проведении исследований в центрах коллективного пользования; помощь в технической подготовке текста; все остальное, что оценивается как полезная помощь, но не является достаточным, чтобы считаться вкладом в авторство работы), ФИНАНСИРОВАНИЕ (информация о грантах и любой другой финансовой поддержке исследований. Просим не использовать в этом разделе сокращенные названия институтов и спонсирующих организаций), КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ, СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ (обязательный раздел при подаче статей в журналы биологической тематики, см. <http://pleiades.online/ru/authors/guidelines/ethicsstatements/>) и СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

Статья может быть разбита на разделы и подразделы с четким выделением их соподчиненности. Названия разделов печатаются прописными буквами на отдельной строке без подчеркивания. Подзаголовки внутри разделов так же печатаются на отдельной строке светлым курсивом.

Экспериментальные статьи должны включать рубрики: МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ, РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Текст. Все части статьи (таблицы, сноски и т.д.) должны быть приведены полностью в соответствующем месте статьи (**каждая таблица печатается на отдельной странице**). Подписи к рисункам представляют на последней странице текста, далее следуют сами рисунки без подписей. В соответствующем месте текста должна быть ссылка на рисунок, а на полях рукописи отмечено место, где о данном рисунке идет речь.

Транскрипция, шрифты, выделения. В тексте статьи следует избегать употребления слов и фамилий в иностранной транскрипции. Прописные (заглавные) буквы внутри фразы допускаются лишь для имен собственных, родовых латинских названий организмов и для существительных на немецком языке. В остальных случаях, в том числе и в списке литературы, все слова внутри фразы пишутся со строчной буквы.

Сокращения и условные обозначения. Следует по мере возможности избегать сокращений, кроме общеупотребительных. Если все-таки используются сокращения, то они должны быть расшифрованы в тексте при их первом упоминании. Допускаются лишь принятые в Международной системе единиц сокращения мер, физических, химических и математических величин и терминов и т.п. В бинарной систематической и аналитической номенклатуре сокращения допускаются при частом и повторном их упоминании, и то лишь в отношении родового названия. **Латинские видовые и родовые названия, а также обозначения генов, даются курсивом** (например, *D. melanogaster*).

Литература. Вся литература должна быть сведена в конце статьи в алфавитные списки **без нумерации** отдельно для русских и иностранных авторов. Работы одного и того же автора располагают в хронологической последовательности. В списке литературы приводят следующие данные: а) фамилию и инициалы автора (авторов), б) название работы, журнала (книги, диссертации), год, том, номер, первую и последнюю страницу (для книг сообщают место издания, издательство и количество страниц, для диссертации – институт, в котором выполнена работа). Название журнала или диссертации – полностью. Обратите внимание на знаки препинания, а так же на то, что фамилии авторов даются курсивом. Указывать следует имена четырех авторов, если их число более четырех, то даются первые три фамилии, далее “и др.” или “et al.”.

Образец:

Иванов А.С., Петров В.Н., Сидоров М.Ю. и др. Название статьи // Название журнала. 1994. Т. 26. С. 15–24.

Андреева С.А. Название книги. М.: Наука, 1990. Общее число страниц в книге (например, 230 с.) или конкретная страница (например, С. 75).

Иванов И.И. Название диссертации: Дис. ... канд. биол. наук. М.: Название института, 1992. 184 с.

В тексте следует ссылаться следующим образом на работы, напечатанные кириллическими шрифтами: (Юрцев, 1992) или “...в смысле А.И. Толмачева (1931)...” (**с непременным указанием инициалов!**); на работы, напечатанные латиницей: (Schulte, 1989) или “...по Ротмалеру (Rothmaler, 1976).” (**без инициалов автора!**). При ссылке на несколько работ одного автора их следует перечислять в хронологическом порядке, используя при необходимости буквенные индексы для обозначения разных работ, опубликованных в один и тот же год, например (Schaefer, 1984, 1985b) или Б.М. Миркин (1989b, 1996). При одновременной ссылке на несколько работ разных авторов их следует перечислять в хронологическом порядке, отделяя друг

от друга точкой с запятой: (Шнюкова, 1977; Зими́на, Сазыкина, 1987; Fogg, 1965). При ссылке на совместную работу двух авторов следует указывать фамилии обоих через запятую: (Tufail, Fogg, 1987). При ссылке на совместную работу более двух авторов следует использовать сокращения и др. или et al. после фамилии первого автора: (Бурковский и др., 1997; Tufail et al., 1989). При прямом цитировании текста необходимо в ссылке указывать номер страницы. Список литературы не должен превышать **120** источников.

Иллюстрации. К статье может быть приложено небольшое число рисунков и схем, предпочтительно в форматах **tiff** и **eps**. Не желательно использовать файлы в формате **jrg**. Все иллюстрации должны быть импортированы в конец файла статьи к соответствующим подрисуночным подписям. При наличии нескольких частей одной иллюстрации они должны быть отмечены как (а), (б), (в) и т.д., располагаться последовательно и иметь общую подпись. Внутри файла не нужно группировать иллюстрации по ячейкам таблицы или каким-либо аналогичным способом. При этом с рукописью обязательно должны быть сданы исходные файлы иллюстраций. Иллюстрации должны иметь размеры, соответствующие их информативности: 8–8.5 см (на одну колонку) или 17–17.5 см (на две колонки); для надписей и обозначений используйте стандартные TrueType шрифты. Просьба не добавлять на задний план иллюстраций серый (цветной) фон или сетки.

Графики и диаграммы желательно готовить в векторных графических редакторах с разрешением не ниже 600 dpi, толщина линий не должна быть меньше 0.5 pt; векторные иллюстрации не должны содержать точечных закрасок, таких как “Noise” “Black&white noise” “Top noise”; для векторной графики все использованные шрифты должны быть включены в файл. Полутоновые иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi. **Иллюстрации, вставленные в WORD не являются оригиналами, должны быть представлены отдельные файлы.**

Представленные фотографии должны быть контрастными, хорошо проработанными в деталях.

Дополнительные материалы к статьям. Для более полного описания исследования, к статье могут прилагаться дополнительные материалы (аудио- и видеофайлы, презентации, дополнительные таблицы и рисунки и пр.) при условии, если автор является правообладателем прилагаемых материалов, и автором ранее не были переданы авторские права на их использование иным (кроме издателя) лицам, либо автор имеет письменное разрешение правообладателя на их использование в целях опубликования и распространения в журнале. **Дополнительные материалы публикуются только в электронной версии журнала.**

Статья должна быть законченным произведением. Не допускается выносить в дополнительные файлы материалы, критически важные для понимания статьи. Дополнительные материалы издателем публикуются в исходном авторском исполнении. Файлы дополнительных материалов должны именоваться по порядку: “ESM_1.mpg”, “ESM_2.pdf”, “ESM_3.xls”. В тексте статьи будет указана ссылка на наличие дополнительных материалов: “Дополнительные материалы для этой статьи находятся по адресу <номер DOI> и доступны для авторизованных пользователей”.

Дополнительные материалы являются частью статьи, на которую распространяются все правила и требования, предъявляемые к статье издателем и действующим законодательством как к самостоятельному объекту авторских прав, в том числе условия о необходимости заключения авторского договора на прилагаемые материалы. Подробнее см. на сайте <http://pleiades.online/ru/authors/guidelines/prepare-electronic-version/supplementary-materials/>.

При отсутствии хотя бы одного из указанных выше элементов рукопись может быть отклонена без рассмотрения по существу.

В случае отклонения статьи редакция высылает автору соответствующее уведомление. Редакция вправе не вступать в переписку с автором относительно причин (оснований) отказа в публикации статьи. Редакция оставляет за собой право на сокращение текста, не меняющее научного смысла статьи.