

ISSN 1026-3470

Номер 1

Январь - Февраль 2024



ИЗВЕСТИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ



Журнал публикует статьи теоретических и экспериментальных исследований по различным аспектам биологии



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Номер 1, 2024

БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Сравнение цитогенетических эффектов импульсного магнитного поля и гамма-излучения при воздействии на клетки меристемы проростков лука (*Allium cepa* L.)

А. Е. Алдибекова, Е. В. Стяжкина, Г. А. Тряпицына, Е. А. Пряхин 3

Уровень экспрессии мРНК *TNFRSF12A* и распределение *TNFRSF12A*⁺ клеток в печени крыс при тиацетамид-индуцированном фиброгенезе

Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко 14

БИОХИМИЯ

Липидкорректирующее и антиоксидантное действие липидного комплекса из морской красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis* в условиях высокожировой диеты

В. Г. Спрыгин, Н. Ф. Кушнерова, С. Е. Фоменко, Е. С. Другова, Л. Н. Лесникова,
В. Ю. Мерзляков 25

Липидный профиль пестряток и смолтов атлантического лосося *Salmo salar* L., выращенных в аквакультуре, при введении разных режимов освещения

Д. С. Провоторов, С. А. Мурзина, В. П. Воронин, Д. И. Манойлова, М. В. Кузнецова,
А. Е. Курицын, Н. Н. Немова 36

МИКРОБИОЛОГИЯ

Грибы в источниках грунтовых вод и колодцах в Московском регионе

А. В. Кураков, А. А. Шумакова, М. Д. Федорова 47

Влияние некоторых метабитотиков штаммов рода *Enterococcus* на рост патогенных бактерий, вызывающих пневмонию

А. Израелян, Ц. Балабекян, З. Саргсян, Ф. Тхруни 60

ЗООЛОГИЯ

Анализ паразитофауны и эндосимбионтов *Lissotriton vulgaris* L., 1758 (Caudata, salamandridae) в природных и урбанистических градиентах среды

А. В. Буракова, Д. Л. Берзин, В. Л. Вершинин 67

Влияние стеариновой кислоты на эффективность криоконсервации эмбрионов домашней кошки (*Felis silvestris catus*)

Е. Ю. Брусенцев, С. В. Окотруб, Д. А. Лебедева, К. А. Окотруб, Т. А. Рахманова,
С. Я. Амстиславский 76

Внебрачные потомки у пеночки-трещотки (*Phylloscopus sibilatrix*) в Центральной России

М. Я. Горецкая, Ю. С. Белоконь, М. М. Белоконь 90

ЭКОЛОГИЯ

Регулирует ли гребневик <i>Mnemiopsis leidyi</i> A. Agassiz, 1865 состав и биомассу мезозоопланктона в глубоководных районах Черного моря?	98
<i>Б. Е. Аннинский, Г. А. Финенко, Н. А. Дацык</i>	
Региональная изменчивость состояния Черноморского ихтиопланктона в период смены весеннего гидрологического сезона на летний	111
<i>П. С. Подрезова, Т. Н. Климова, А. А. Субботин, И. В. Вдодович, А. В. Завьялов</i>	
Эмиссия оксидов азота в почвах бореальных лесов (обзор)	122
<i>С. М. Разгулин</i>	
Комплексный анализ формирования окон в пологе старовозрастного широколиственного леса	133
<i>А. М. Портнов, М. П. Шашков, В. Н. Шанин и др.</i>	
Состав жирных кислот, фитостеринов и суммарное содержание антиоксидантов семян <i>Morus</i> L.	143
<i>Ф. И. Исламова, Г. К. Раджабов, С. В. Горяинов, Ф. Хажжар, А. М. Алиев</i>	

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Физиолого-биохимические показатели эритроцитов у Беломорских морских зайцев <i>Erignathus barbatus barbatus</i> Erxleben, 1777 (Phocidae) различного возраста	151
<i>И. А. Ерохина</i>	

СРАВНЕНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ И ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА КЛЕТКИ МЕРИСТЕМЫ ПРОРОСТКОВ ЛУКА (*ALLIUM CEPA* L.)

© 2024 г. А. Е. Алдибекова*, @, Е. В. Стяжкина*, **, Г. А. Тряпицына*, **, Е. А. Пряхин*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Уральский научно-практический центр радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства России”,
ул. Воровского, 68а, Челябинск, 454141 Россия

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Челябинский государственный университет”, ул. Братьев Кашириных, 129, Челябинск, 454001 Россия

@ E-mail: albinaaes@gmail.com

Поступила в редакцию 02.02.2023 г.

После доработки 04.06.2023 г.

Принята к публикации 05.06.2023 г.

Сравнивали действие импульсного магнитного поля (ИМП) на клетки меристемы проростков семян лука с эффектами острого гамма-облучения с помощью аллиум-теста. Выявлено, что ИМП с несущей частотой 1.8 МГц, частотой повторения импульсов 28 кГц, индукцией магнитного поля в импульсе 75 мТл приводит к увеличению митотического индекса, преимущественно за счет увеличения доли клеток в профазе, увеличению частоты клеток с хромосомными aberrациями в ана-телофазе и не влияет на частоту клеток с микроядрами. Высказано предположение, что ИМП вызывает в клетках растений неспецифический оксидативный стресс, сопровождающийся задержкой клеточного цикла в сверхочной точке (G2/M) и индукции повреждений ДНК. По этим показателям ИМП напоминает действие ионизирующего излучения в дозах 0.05–0.5 Гр.

Ключевые слова: импульсное магнитное поле, гамма-облучение, allium test, хромосомные aberrации, клеточный цикл, микроядра

DOI: 10.31857/S1026347024010012, **EDN:** LXFYFN

Магнитное поле (МП) является фактором окружающей среды, который оказывал влияние на живые организмы в течение всего периода их эволюции на Земле. В последние сто лет происходит массовое внедрение оборудования и технологий, что приводит к широкому распространению воздействия на живые организмы, в том числе и человека, магнитных и электромагнитных полей (ЭМП) с частотами, модуляцией и интенсивностями, отличающимися от природных МП. Поскольку воздействие техногенных ЭМП на живые организмы с эволюционной точки зрения началось лишь недавно, у них не было возможности адаптироваться к ней (Belyavskaya, 2004). Это требует, с одной стороны, определения безопасных уровней воздействия ЭПМ на биологические системы, а с другой — дает возможность использовать эти электромагнитные поля в качестве одного из стрессоров для изучения функционирования биологических систем.

Механизмы биологического действия МП остаются далекими от полного понимания. Результаты

некоторых исследований *in vitro* показывают, что электромагнитные поля не оказывают прямого мутагенного действия на ДНК, но модифицируют активность ферментов (Loeschinger *et al.*, 1998); МП может генерировать в биологических системах индукционные токи и таким образом менять мембранный клеточный потенциал (Goodman *et al.*, 1986).

Импульсные магнитные поля (ИМП) применяются в научных исследованиях, материаловедении, геологии, медицине (Livshiz, Gafr, 1999; Shaburova *et al.*, 2022). “Пороговая” чувствительность, начиная с которой регистрируются биологические реакции, оценивается в 3 мТл для переменного магнитного поля и в 0.1 мТл для ИМП (Боголюбов, 1978).

Одним из способов изучения биологического действия ИМП может быть сравнение его эффектов с действием факторов, для которых биологическое действие хорошо изучено, например с гамма-излучением. Ионизирующее излучение приводит к широкому спектру биологических эффектов

Таблица 1. Экспериментальные группы

№ группы	Воздействие ИМП, время	№ группы	Доза гамма-облучения, Гр
1	Ложное воздействие		
2	1 с	8	0,05
3	10 с	9	0,1
4	30 с	10	0,5
5	60 с	11	1,0
6	5 мин	12	3,0
7	30 мин	13	5,0

(от стимуляции развития до угнетения и гибели) при изучении влияния на растениях и животных (Donà *et al.*, 2013; Bolsunovsky *et al.*, 2018). При этом основной мишенью для гамма-излучения является ДНК (Olive, 1998).

Аллиум-тест (Allium test) – растительная тест-система, используемая при оценке мутагенного влияния факторов различной природы (Evseeva *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2020; Priakhin *et al.*, 2020).

Целью настоящего исследования является сравнительный анализ цитогенетических эффектов в клетках растений при воздействии ИМП и острого гамма-облучения с использованием аллиум-теста.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись проростки семян лука репчатого (*Allium cepa* L.) сорта “Забияка” (ООО «Группа компаний “Гавриш”», партия 25753).

Характеристики факторов воздействия. Гамма-облучение проводили на исследовательской гамма-установке радиобиологической ИГУР-1М с 4 источниками ^{137}Cs . Мощность дозы гамма-излучения составляла 0.7 Гр/мин, неравномерность гамма-поля в рабочем пространстве не более 5%. Острое γ -облучение проросших семян проводили в дозах 0.05; 0.1; 0.5; 1; 3 и 5 Гр.

В экспериментах использовали генератор импульсного магнитного поля, предназначенный для оценки влияния импульсного магнитного поля на биологические объекты (Галузо, Козлов, 2006). Прибор генерирует импульсное магнитное поле, которое имеет следующие параметры: несущая частота 1.8 МГц, импульсное магнитное поле модулировано импульсами с фронтом длительностью 40 нс и плавным нисходящим спадом, напоминающим параболу. Частота повторения импульсов – 28 кГц, длительность импульса по уровню 0.7 равна 2.7 мкс. Индукция МП в месте расположения

биологических объектов составила 75 мТл. Воздействие ИМП на проросшие семена проводили в течение 1; 30; 60 с; 5 и 30 мин.

Схема эксперимента. Аллиум-тест проводили с использованием семян лука в соответствии с протоколом (Паушева, 1988). Семена лука для синхронизации клеточного цикла до эксперимента хранили в холодильнике при температуре 4–5°C в течение суток. За 1 час до начала эксперимента семена извлекали из холодильника.

В эксперименте было сформировано 12 групп (табл. 1), в том числе группа ложного воздействия, где проростки семян лука подвергали таким же манипуляциям, как при воздействии ИМП или гамма-облучения, но без воздействия исследуемых физических факторов.

Для исследования семена помещали в чашки Петри с фильтровальной бумагой (“Красная лента”), добавляли по 3.0 мл дистиллированной воды и оставляли в термостате при $t = 24.0^\circ\text{C}$. На третьи сутки семена с проростками длиной 1 см помещали в пробирки Эппендорфа объемом 1.5 мл по 20 проростков семян в 1 пробирку, в пробирки добавляли 100 мкл дистиллированной воды и подвергали воздействию острого гамма-излучения или ИМП согласно протоколу эксперимента. После экспериментального воздействия семена переносили в новые чашки Петри с фильтровальной бумагой, добавляли по 3 мл дистиллированной воды и помещали в термостат при температуре 24.0°C. Через 24 ч проростки фиксировали фиксатором Кларка (спирт 96%, ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1) в течение суток при температуре 4°C, затем промывали и фиксировали 70% спиртом для длительного хранения.

Для приготовления давленного препарата фиксированные корешки промывали дистиллированной водой, помещали в 2% раствор ацетоорсеина, нагревали до появления признаков кипения, оставляли на сутки. Далее из корня проростка скальпелем отделяли участок меристемы (2 мм с апикального конца) и готовили давленный препарат для микроскопии. Анализ проводили на микроскопе ZEISS AXIO Scope.A1, объектив 40×/0.75, окуляры 10×/23.

Показатели. Определяли митотическую активность, частоту клеток с микроядрами и частоту ана- и телофаз с аберрациями (Grant, 1982; Fiskesjo, 1985; Прохорова и др., 2005). Для оценки митотической активности меристематической ткани подсчитывали процент делящихся клеток от общего числа проанализированных клеток (МИ, % доля делящихся клеток). Определяли соотношение фазных индексов как долю клеток в каждой фазе митоза: профаза, метафаза, анафаза, телофаза (Паушева, 1988). Было проанализировано более 9000 клеток меристемы.

Был проведен анализ хромосомных aberrаций в ана-телофазе (фрагменты, мосты, отстающие хромосомы и др.) и рассчитана частота клеток с aberrациями. Было проанализировано не менее 500 клеток на стадии ана-телофазы в каждой экспериментальной группе. Частоту клеток с aberrациями рассчитывали как отношение суммы ана- и телофазных клеток, в которых были зарегистрированы хромосомные aberrации, к общему числу проанализированных ана-телофаз (% клеток с нарушениями).

Был проведен анализ спектра aberrаций, для этого выделяли три группы нарушений согласно работе (Удалова и др., 2016): хроматидные (одиночные мосты (m1) и фрагменты (f1)), хромосомные (двойные мосты (m2) и фрагменты (f2)), геномные (отстающие хромосомы (lg) и многополюсные митозы (3p)).

Для определения частоты клеток с микроядрами было проанализировано не менее 7000 клеток меристемы лука. Выявляли микроядра в цитоплазме интерфазных клеток, рассчитывали долю клеток с микроядрами (МЯ, %).

Статистический анализ. Данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием пакета MS Excel и Past 3.10. При регрессионном анализе использовали метод наименьших квадратов. Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро – Уилка. Для сравнения показателей митотического индекса применяли двухвыборочный t-критерий Стьюдента (Barberio *et al.*, 2011). При сравнении средних показателей частоты клеток с хромосомными aberrациями, различные типы aberrаций и частота клеток с микроядрами использовали непараметрический метод χ^2 (Rank, 2003). Различия принимали статистически значимыми при $p < 0,05$. Сравнения 3 групп по количественным показателям с ненормальным распределением проводили с помощью критерия Краскела – Уоллиса с дальнейшим попарным расчетом критерия Манна – Уитни (Кузовлев и др., 2021). Согласно поправке Бонферрони корректировка производится по формуле $\alpha_B = \alpha/m$, где α – первоначальный уровень альфа (0.050); α_B – скорректированный уровень α с помощью поправки Бонферрони; m – число сравнений (гипотез) (Наркевич и др., 2020). Различия принимали статистически значимыми при $p < 0.017$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Анализ влияния исследуемых факторов на митотический индекс

Распределение величины митотического индекса статистически значимо не отличалось от нормального: $W_{(47)} = 0.99$; $p = 0.87$. В группе ложного

воздействия митотическая активность составляла $8.1 \pm 0.3\%$ (табл. 2).

Величина митотической активности клеток меристемы в корнях проростков семян лука после воздействия ИМП во всех экспериментальных группах была статистически значимо выше уровня ложного воздействия ($t = 8.89$; $p < 0.001$). При проведении регрессионного анализа не было выявлено зависимости митотического индекса от времени воздействия ИМП ($R^2 = 0.02$; $F = 0.49$; $p = 0.48$). Профазный индекс во всех группах ИМП был статистически значимо ($t = 15.16$, $p < 0.001$) выше, чем в группе ложного воздействия.

При анализе митотической активности клеток меристемы после гамма-облучения не было выявлено четкой зависимости от дозы этого показателя ($R^2 = 0.0003$; $F = 0.008$; $p = 0.93$). Статистически значимое увеличение показателя митотической активности было зарегистрировано при облучении проростков семян в дозах 0.05; 0.5; 1.0; 5.0 Гр. Такие изменения происходили преимущественно за счет увеличения длительности профазы. При анализе данных было обнаружено, что профазный индекс во всех группах с воздействием гамма-излучения статистически значимо был выше ($p < 0.001$), чем в группе ложного воздействия. При проведении регрессионного анализа не было выявлено статистически значимой зависимости профазного индекса от дозы ($R^2 = 0.004$; $F = 0.1$, $p = 0.7$).

Кроме профазного индекса в клетках меристемы проростков лука гамма-излучение приводило к изменению длительности анафазы и телофазы. При проведении регрессионного анализа было показано, что анафазный индекс снижался с увеличением дозы облучения согласно линейной функции ($R^2 = 0.16$; $F = 5.5$; $p = 0.02$). Телофазный индекс был статистически значимо меньше в группах с гамма-облучением в дозах 0.05; 0.5, 1.0 и 3.0 Гр.

2. Анализ влияния исследуемых факторов на частоту клеток в ана-телофазе с aberrациями

Распределение величины частоты клеток с aberrациями статистически значимо отличались от нормального ($W_{(47)} = 0.64$; $p < 0.001$). Частота клеток с aberrациями в ана-телофазе меристемы проростка лука в группе ложного воздействия составила $4.6 \pm 1.0\%$ (табл. 3). ИМП приводило к повышению частоты клеток с aberrациями: статистически значимое увеличение показателя было зарегистрировано в группах с воздействием ИМП в течение 10 с, 60 с, 5 мин и 30 мин. При воздействии ИМП в течение 1 и 30 с частота клеток с aberrациями статистически значимо не отличалась от значения показателя в группе ложного воздействия.

Регрессионный анализ показал отсутствие зависимости частоты клеток с aberrациями от времени

Таблица 2. Показатели митотической активности клеток меристемы проростков семян *Allium cepa* L.

Экспериментальные группы	Митотический индекс, %	Профазный индекс, %	Метафазный индекс, %	Анафазный индекс, %	Телофазный индекс, %
1	8.1 ± 0.3	32.7 ± 1.5	23.1 ± 1.4	15.8 ± 1.2	28.3 ± 1.5
2	10.8 ± 0.3*	43.0 ± 1.5*	21.7 ± 1.2	11.8 ± 1.0*	23.4 ± 1.3*
3	9.3 ± 0.3*	37.2 ± 1.5*	23.0 ± 1.3	9.2 ± 0.9*	30.7 ± 1.4
4	10.0 ± 0.3*	31.9 ± 1.5	25.2 ± 1.4	14.4 ± 1.1	28.5 ± 1.4
5	11.5 ± 0.3*	42.5 ± 1.4*	21.6 ± 1.2	10.0 ± 0.8*	26.0 ± 1.2
6	12.6 ± 0.4*	43.0 ± 1.5*	19.0 ± 1.2*	10.7 ± 0.9*	27.4 ± 1.4
7	9.6 ± 0.3*	43.5 ± 1.5*	20.1 ± 1.2	10.0 ± 0.9*	27.0 ± 1.4
Среднее для всех групп ИМП	11.0 ± 0.1	40.4 ± 1.8	21.7 ± 0.5	11.0 ± 0.4	27.0 ± 0.5
8	11.1 ± 0.3*	40.8 ± 1.3*	22.0 ± 1.1	12.7 ± 0.8*	24.6 ± 1.1*
9	8.8 ± 0.2	39.0 ± 1.4*	21.7 ± 1.3	12.0 ± 0.9*	27.5 ± 1.3
10	10.2 ± 0.3*	46.0 ± 1.5*	20.5 ± 1.2	10.2 ± 0.9*	23.3 ± 1.2*
11	9.7 ± 0.3*	41.2 ± 1.4*	23.8 ± 1.3	13.0 ± 1.0*	22.1 ± 1.2*
12	8.1 ± 0.2	44.4 ± 1.5*	24.2 ± 1.4	8.3 ± 0.8*	23.1 ± 1.2*
13	10.4 ± 0.3*	38.0 ± 1.5*	21.6 ± 1.5	9.4 ± 0.9*	31.0 ± 1.5
Среднее для всех групп гамма-облучения	10.0 ± 0.1*	41.6 ± 1.8*	22.3 ± 0.5	11.0 ± 0.4*	25.1 ± 0.5*

Примечание. * – статистически значимое отличие от группы контроля при значении $p < 0.05$. ** – статистически значимое отличие всех доз гамма-облучения от группы всех сроков воздействия ИМП при значении $p < 0.017$.

Таблица 3. Частота клеток с абберациями в ана-телофазе в меристеме проростков семян *Allium cepa* L.

Экспериментальные группы	Условия эксперимента	Кол-во А-Т	ХА, %
1	Ложное воздействие	500	4.6 ± 1.0
2	ИМП, 1 с	613	6.0 ± 1.1
3	ИМП, 10 с	580	8.3 ± 1.2*
4	ИМП, 30 с	453	5.2 ± 1.0
5	ИМП, 60 с	501	10.6 ± 1.3*
6	ИМП, 5 мин	452	8.0 ± 1.2*
7	ИМП, 30 мин	505	10.0 ± 1.4*
Среднее для всех групп ИМП	ИМП, все сроки	3041	8.0 ± 1.2*
8	γ-облучение, 0.05 Гр	613	8.3 ± 1.1*
9	γ-облучение, 0.1 Гр	580	9.0 ± 1.2*
10	γ-облучение, 0.5 Гр	453	10.8 ± 1.5*
11	γ-облучение, 1.0 Гр	501	15.0 ± 1.6*
12	γ-облучение, 3.0 Гр	452	25.0 ± 2.0*
13	γ-облучение, 5.0 Гр	505	38.4 ± 2.2*
Среднее для всех групп гамма-облучения	γ-облучение, все дозы	3104	17.7 ± 1.6*

Примечание. * – статистически значимое отличие от группы контроля при значении $p < 0.05$. ** – статистически значимое отличие всех доз гамма-облучения от группы всех сроков воздействия ИМП при значении $p < 0.017$.

воздействия ИМП ($R^2 = 0.026$; $F = 1.21$; $p = 0.3$). Таким образом, ИМП независимо от длительности воздействия (в исследуемом диапазоне до 30 мин) приводит к повышению частоты клеток с абберациями на 57% по сравнению с ложным воздействием.

Цитогенетический анализ показал, что гамма-излучение приводит к дозозависимому повышению частоты абберантных клеток в ана-телофазе (рис. 1).

Статистически значимое повышение частоты клеток с абберациями было обнаружено при радиационном воздействии в дозе 0.05 Гр и выше. В диапазоне доз до 5 Гр частота клеток с хромосомными абберациями линейно зависит от дозы гамма-облучения ($R^2 = 98.40$; $F = 309.90$; $p < 0.001$).

В ходе ана-телофазного анализа проводили анализ спектра аббераций хромосом (табл. 4). В группе ложного воздействия регистрировали только хроматидные абберации. В группах воздействия ИМП основной вклад в спектр нарушений вносили хроматидные абберации ($7.4 \pm 0.3\%$) и в меньшей степени хромосомные абберации ($0.2 \pm 0.2\%$) и геномные ($0.3 \pm 0.2\%$).

Средняя частота хроматидных аббераций при гамма-облучении в дозах 0.05–0.5 Гр составила $8.8 \pm 1.2\%$; частота хромосомных аббераций – $0.5 \pm 0.3\%$; геномных – $0.13 \pm 0.13\%$. При гамма-облучении в дозах 1.0–5.0 Гр частота всех типов аббераций была существенно больше: частота хроматидных аббераций составила $19.0 \pm 1.8\%$; частота хромосомных аббераций – $3.9 \pm 0.8\%$; частота геномных – $2.6 \pm 0.7\%$.

Результаты однофакторного дисперсионного анализа показали, что значения средних статистически значимо отличаются в трех группах (ИМП; гамма-облучение в дозах 0.05–0.5 Гр; гамма-облучение в дозах 1.0–5.0 Гр) ($N = 7.2$; $p = 0.03$). Попарное сравнение методом Манна – Уитни показало, что они были обусловлены различиями частоты аббераций в группе ИМП и гамма-облучения в дозе 1.0–5.0 Гр, для хроматидных аббераций значение $p = 0.03$; для хромосомных аббераций – $p = 0.02$; для геномных аббераций – $p = 0.03$. Но с учетом поправки Бонферрони в этих группах не было выявлено статистически значимого отличия, как и при сравнении группы ИМП и гамма-облучения в дозах 0.05–0.5 Гр: частота хроматидных ($p = 0.2$), хромосомных ($p = 0.5$) и геномных аббераций ($p = 0.6$).

3. Анализ влияния исследуемых факторов на частоту клеток с микроядрами

Распределение величины частоты клеток с абберациями статистически значимо отличалось от нормального: $W_{(47)} = 0.71$; $p < 0.001$. При анализе

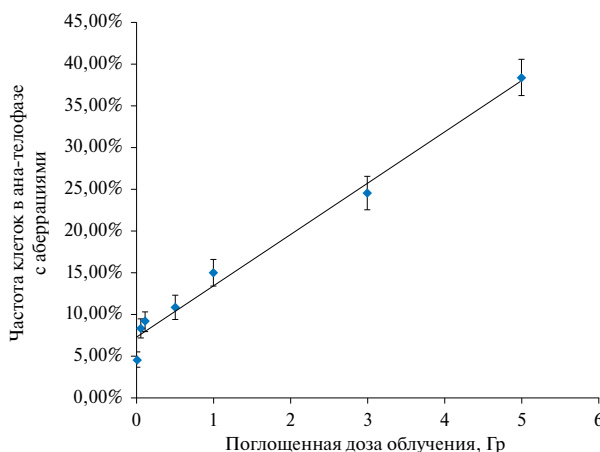


Рис. 1. Линейная модель зависимости частоты клеток с хромосомными абберациями от дозы облучения гамма-излучения.

частоты клеток с микроядрами в группе ложного воздействия было выявлено, что этот показатель составляет $0.09 \pm 0.03\%$. Частота клеток меристемы проростков с микроядрами ни в одной из экспериментальных групп после воздействия ИМП статистически значимо не отличалась от группы ложного воздействия (табл. 5).

Гамма-излучение приводило к повышению частоты клеток с микроядрами. Статистически значимые отличия частоты клеток с микроядрами регистрировались при радиационном воздействии 0.1 Гр ($\chi^2 = 12.4$; $p < 0.001$) и больше. При дозе 1 Гр частота клеток с микроядрами достигала $2.2 \pm 0.1\%$, и далее с увеличением дозы γ -облучения в наших экспериментах показатель существенно не менялся.

При проведении регрессионного анализа зависимости частоты клеток меристемы с микроядрами через 24 ч после гамма-облучения в дозах до 5 Гр было выявлено, что линейная модель (рис. 2) удовлетворительно описывает данную зависимость ($R^2 = 0.41$; $F = 21.3$; $p < 0.001$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Широкое распространение применения технологий, связанных с использованием ИМП в медицине, материаловедении, научных исследованиях, требует прояснения механизмов действия этого физического фактора (Wahab, 2007; Tkalec, 2009; Yalçın, Erdem, 2012). Несмотря на успехи в этом направлении, остается очень много вопросов (Sarraf *et al.*, 2020). Одним из подходов к изучению биологического действия ИМП может быть сравнение его эффектов с действием хорошо изученных физических факторов, например ионизирующего излучения. Одним из удобных и эффективных

Таблица 4. Спектр aberrаций в ана-телофазе клеток меристемы проростков семян лука

Группа	f' + m', %	f'' + m'', %	lg, %
0	4.6 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
1	5.4 ± 1.0	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2
10	7.9 ± 1.2*	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2
30	5.0 ± 0.9	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0
60	9.4 ± 1.3*	0.2 ± 0.2	0.9 ± 0.4*
300	7.4 ± 1.2	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2
1800	9.5 ± 1.3*	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2
Среднее для всех групп ИМП	7.4 ± 1.2*	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.2
0,05	8.2 ± 1.1*	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.2
0,1	8.3 ± 1.1*	0.9 ± 0.4*	0.0 ± 0.0
0,5	9.9 ± 1.4*	0.7 ± 0.4	0.2 ± 0.2
1	13.6 ± 1.5*	0.4 ± 0.3	1.0 ± 0.4*
3	18.4 ± 1.8*	2.9 ± 0.8*	3.8 ± 0.9*
5	25.2 ± 1.9*	8.5 ± 1.2*	3.2 ± 0.8*
Среднее для всех групп гамма-облучения	13.6 ± 1.5*	2.1 ± 0.6*	1.3 ± 0.5*

Примечание. f' + m' – хроматидные aberrации; f'' + m'' – хромосомные aberrации; lg – геномные aberrации; одиночные мосты (m') и фрагменты (f'), двойные мосты (m'') и фрагменты (f''), отстающие хромосомы (l), * – статистически значимое отличие от группы контроля при значении $p < 0.05$, ** – статистически значимое отличие всех доз гамма-облучения от группы всех сроков воздействия ИМП при значении $p < 0.017$.

Таблица 5. Частота клеток с микроядрами в меристеме проростков семян лука *Allium cepa* L.

Экспериментальные группы	Условия эксперимента	Кол-во подсчитанных клеток	Частота клеток с микроядрами, %
1	Ложное воздействие	10898	0.09 ± 0.03
2	ИМП, 1 с	9362	0.2 ± 0.04
3	ИМП, 10 с	10312	0.06 ± 0.02
4	ИМП, 30 с	8961	0.1 ± 0.03
5	ИМП, 60 с	9620	0.1 ± 0.04
6	ИМП, 5 мин	7459	0.1 ± 0.04
7	ИМП, 30 мин	10107	0.2 ± 0.04
Среднее для всех групп ИМП	ИМП, все сроки	55821	0.1 ± 0.04
8	γ-облучение, 0.05 Гр	11274	0.05 ± 0.02
9	γ-облучение, 0.1 Гр	12372	0.3 ± 0.05*
10	γ-облучение, 0.5 Гр	9197	0.3 ± 0.06*
11	γ-облучение, 1.0 Гр	11274	2.2 ± 0.1*
12	γ-облучение, 3.0 Гр	11738	2.2 ± 0.1*
13	γ-облучение, 5.0 Гр	8618	2.0 ± 0.2*
Среднее для всех групп гамма-облучения	γ-облучение, все дозы	64473	1.2 ± 0.1*

Примечание. * – статистически значимое отличие от группы контроля при значении $p \leq 0.05$, ** – статистически значимое отличие всех доз гамма-облучения от группы всех сроков воздействия ИМП при значении $p < 0.017$.

биологических объектов для изучения действия физических факторов являются клетки растений, в частности *Allium cepa* L. Аллиум-тест является одним из очень эффективных инструментов оценки генотоксического действия различных факторов (Evseeva *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2020; Pryakhin *et al.*, 2020).

Изменение митотической активности клеток меристемы можно рассматривать как интегральный показатель воздействия исследуемых факторов на клеточный цикл. На основании полученных результатов делают вывод о митотоксическом или митостимулирующем действии изучаемого фактора (Прохорова и др., 2003). В то же время известно, что снижение величины МИ ниже 50% от контрольной величины (порог цитотоксичности) может привести к сублетальному эффекту для организма (Panda *et al.*, 1985). Также большое значение имеет процентное соотношение клеток, находящихся в различных фазах митоза. Данные показатели нужны для выявления возможных отклонений в продолжительности стадий митоза и регулярности прохождения клеточного цикла.

В наших экспериментах величина митотической активности клеток меристемы в корнях проростков семян лука после воздействия ИМП во всех экспериментальных группах достоверно увеличивалась в диапазоне от 9.3 до 12.6%, что на 14–55% больше по сравнению с группой ложного воздействия. Однако говорить о митостимулирующем действии на пролиферацию в данном случае преждевременно, так как повышение МИ, как обсуждалось в работах (Калаев и др., 2003; Удалова и др., 2016), может быть связано с задержкой на стадии G2/M, что проявлялось в повышении профазного индекса в наших экспериментах, который во всех группах с воздействием ИМП статистически значимо был выше, чем в группе ложного воздействия.

Похожие эффекты в виде увеличения МИ были выявлены при действии малых доз ионизирующего излучения на клетки меристемы корня лука. Так, при внешнем γ -облучении луковиц *A. cepa* в дозах 0.1 и 0.2 Гр было обнаружено стимулирующее действие на митотическую активность ионизирующего излучения (Синовец и др., 2009). В наших экспериментах также было выявлено статистически значимое увеличение показателя МИ при облучении проростков семян в дозах 0.05; 0.5; 1.0; 5.0 Гр. Такие изменения происходили так же, как и при воздействии ИМП, преимущественно за счет увеличения длительности профазы.

В наших экспериментах ИМП приводило к повышению частоты клеток в ана-телофазе с абберациями: статистически значимое увеличение показателя было зарегистрировано в группах с воздействием ИМП в течение 10 с, 60 с, 5 мин и 30 мин. Полученные данные указывают на то, что ИМП

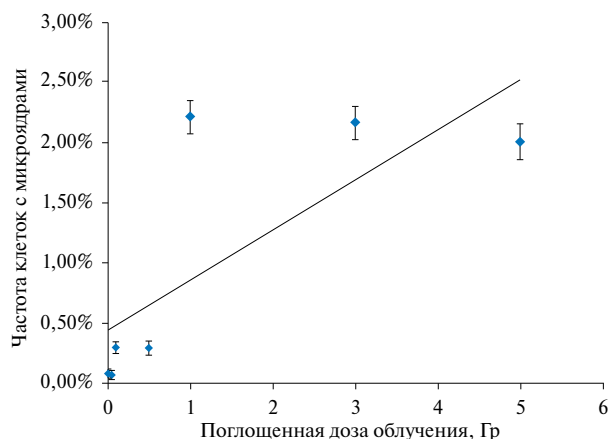


Рис. 2. Линейная модель зависимости частоты клеток с микроядрами от поглощенной дозы облучения.

с несущей частотой 1.8 МГц, частотой повторения импульсов 28 кГц, индукцией МП 75 мТл в импульсе обладает генотоксическим эффектом. При этом регрессионный анализ показал отсутствие зависимости частоты клеток с абберациями от времени воздействия ИМП. Таким образом, ИМП, независимо от длительности воздействия (от 10 с до 30 мин), приводит к повышению частоты клеток с абберацией в среднем на 57% по сравнению с ложным воздействием.

В ряде работ также были выявлены генотоксические эффекты ИМП при воздействии на клетки грибов и животных. Исследования на животных показали, что электромагнитные поля могут оказывать генотоксическое воздействие и приводить к значительному увеличению повреждения ДНК у крыс после воздействия магнитных полей с частотой 60 Гц и магнитной индукцией 10 Тл в течение 24 или 48 часов (Singh, Lai, 1998). Импульсные магнитные поля при длительном воздействии (частота — 25 Гц, магнитная индукция в импульсе — 1.5 мТл, при воздействии 8 ч/сут в течение 16 сут) приводило к увеличению спонтанной деградации ДНК геномной ДНК дрожжей (López-Díaz *et al.*, 2014).

Гамма-облучение в наших экспериментах приводило к четкой линейной зависимости частоты клеток с абберациями от дозы. Следует отметить, что генотоксические эффекты ИМП в наших экспериментах были сопоставимы с генотоксическими эффектами острого гамма-облучения в дозах 0.05–0.5 Гр ($p = 0.25$).

В работах С. А. Гераськина (Geras'kin *et al.*, 2007) и А. А. Удаловой (Удалова и др., 2016) было показано, что взаимосвязь между частотой абберантных клеток в меристеме проростков ячменя и поглощенной дозой является нелинейной. Начиная с дозы гамма-облучения 0.05 Гр до 0.5 Гр, частота клеток с абберациями была резко увеличена

и в этом диапазоне была одинаковой, не зависела от дозы; этот участок авторы обозначили как “плато”; в дальнейшем с увеличением дозы гамма-облучения частота клеток с ХА линейно увеличивалась с увеличением дозы гамма-облучения (Oudalova *et al.*, 2002; Geras'kin *et al.*, 2007). Результаты, полученные в наших экспериментах по изучению влияния гамма-излучения на частоту клеток с абберациями в клетках меристемы лука, не противоречат этим данным. Авторы объясняют плато в диапазоне от 0.05 до 0.5 Гр эффективной системой адаптивного ответа и конститутивной репликативной репарацией.

В наших экспериментах одинаковый уровень частоты аббераций при воздействии ИМП (в диапазоне от 10 с до 30 мин), напоминающий “плато” в зависимости дозы — эффект, выявленная в эксперименте С. А. Гераськина (Geras'kin *et al.*, 2007), позволяет предположить, что ИМП, гамма-облучение в дозах 0.05–0.5 Гр и, возможно, другие неблагоприятные факторы индуцируют в клетках растения неспецифическую, одинаковой степени выраженности реакцию, которая сопровождается и повреждением ДНК, и включением адапционных систем репарации. Так, в работе было показано, что электрические поля и ИМП могут индуцировать в клетках оксидативный стресс (Panagoropoulos *et al.*, 2021).

Для сравнения механизмов действия ИМП и гамма-облучения был проведен анализ спектра аббераций, регистрируемых в аллиум-тесте. В группах воздействия ИМП основной вклад в спектр нарушений вносили хроматидные абберации. Следует отметить, что данные эффекты ИМП в наших экспериментах были сопоставимы с действием острого гамма-облучения в дозах 0.05–0.5 Гр. При сравнении показателей в группах ИМП и гамма-облучения в дозах 0.05–0.5 Гр не было выявлено статистически значимых отличий частоты хроматидных ($p = 0.2$), хромосомных ($p = 0.5$) и геномных ($p = 0.6$) аббераций. Эти результаты не противоречат высказанной выше гипотезе о том, что ИМП и малые дозы ИИ индуцируют в клетках оксидативный стресс.

Анализ частоты клеток в меристеме с микроядрами является широко используемым приемом при проведении аллиум-теста (Синовец, 2009; Bolsunovsky *et al.*, 2018). Микроядра в клетках формируются в результате повреждения ДНК или как следствие геномной нестабильности (Ильинских и др., 1992; Sommer *et al.*, 2020). Механизмы формирования микроядер хорошо известны и описаны в литературе (Fenech, Morley, 1985; Sommer *et al.*, 2020). Основными механизмами являются: формирование микроядер из ацентрических фрагментов хромосом (Ильинских и др., 1992; Цховребова и др., 2017); нарушение расхождения хромосом в результате дисфункции центромер, кинетохор,

веретена деления (Sommer *et al.*, 2020); дигенетический разрыв хромосом (Fenech *et al.*, 2011); нестабильность хромосом (Terradas *et al.*, 2009); агрегирование двойных мини-хромосом (Кисурин-Евгеньева и др., 2016, Sommer *et al.*, 2020). Воздействие радиации вызывает образование в том числе двунитевые разрывы ДНК, что в дальнейшем проявляется в возникновении клеток с микроядрами (Terradas *et al.*, 2009).

В наших экспериментах, вероятнее всего, повышение частоты клеток с микроядрами при воздействии гамма-излучения было связано с формированием микроядер из фрагментов хромосом или отстающих хромосом в клетках, которые на момент облучения находились на стадии S/G2 клеточного цикла и которые за 24 ч после облучения успели пройти митоз.

Частота клеток с микроядрами после воздействия ИМП статистически значимо не отличалась от значения показателя в группе ложного воздействия. Эти данные соответствуют результатам анализа частоты хромосомных и геномных аббераций: во всех группах воздействия ИМП не было выявлено статистически значимого изменения этих типов аббераций. Наши результаты не противоречат данным, полученным в работе С. Б. Редди (Reddy *et al.*, 2010), которые не выявили изменений частоты клеток с микроядрами в полихроматофильных эритроцитах периферической крови и костного мозга у мышей, подвергшихся воздействию ИМП. Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что ИМП приводит к повышению частоты хроматидных аббераций и не вызывает изменений частоты хромосомных и геномных аббераций, которые могут реализовываться в повышении частоты клеток с микроядрами (Цховребова и др., 2017).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Воздействие ИМП на клетки меристемы проростков семян лука, как и гамма-излучение, приводило к увеличению профазного индекса, что в свою очередь было связано с увеличением митотического индекса. Полученные нами результаты позволяют полагать, что ИМП (несущая частота — 1.8 МГц, частотой повторения импульсов — 28 кГц, длительность импульса по уровню 0.7 равной 2.7 мкс с индукцией магнитного поля в месте расположения биологических объектов 75 мТл) так же, как и гамма-облучение, может вызывать задержку клеточного цикла в сверочной точке G2/M.

ИМП приводит к повышению частоты клеток меристемы проростка семян лука на стадии ана-телофазы с абберациями (при воздействии в течение 10 с, 60 с—30 мин) в среднем на 80%. По выраженности этот эффект в наших экспериментах был аналогичен эффекту гамма-облучения в дозах 0.05–0.5 Гр.

В группах воздействия ИМП основной вклад в спектр нарушений вносили хроматидные аберрации и в меньшей степени хромосомные аберрации и геномные. ИМП по спектру генотоксических эффектов было сопоставимо с эффектами гамма-облучения в дозах 0.05–0.5 Гр и отличалось от эффектов гамма-облучения в дозах 1.0–5.0 Гр.

ИМП не приводило к повышению частоты клеток с микроядрами, что, вероятно, связано с преобладанием хроматидного типа аберраций при таком воздействии, которые не приводят к образованию микроядр. По этому показателю ИМП отличалось от эффектов гамма-облучения, которое приводило к повышению частоты клеток с микроядрами при облучении в дозах больше 0.1 Гр.

Высказано предположение, что ИМП приводит к индукции в клетках оксидативного стресса, сопровождающегося остановкой клеточного цикла в сверочной точке (G2/M) и индукции повреждений ДНК, реализующихся в виде хроматидных аберраций при проведении аллиум-теста. ИМП по индукции такого оксидативного стресса похоже на действие малых доз ионизирующего излучения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда содействия развитию. Фундаментальные исследования, проект №. 19-52-40003.

ЭТИЧЕСКОЕ ОДОБРЕНИЕ И СОГЛАСИЕ УЧАСТВОВАТЬ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Боголюбов В.М., Скурихина Л.А. Биологическое действие постоянного и переменного низкочастотного магнитного поля // Вопросы курортологии, физиотерапии и ЛФК. 1978. № 6. С. 64–72.

Галузо С.Ю., Козлов В.И. Импульсное магнитное поле: лабораторный практикум по общей физике (электричество и магнетизм). М.: МГУ, 2006. 10 с.

Ильинских Н.Н., Новицкий В.В., Ванчугова Н.Н., Ильинских И.Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск: Изд-во Томского ун-та, 1992. 272 с.

Калаев В.Н., Буторина А.К., Панов А.В., Левин М.Н. Влияние электрического поля на цитогенетические показатели клеток апикальной меристемы проростков семян дуба черешчатого (*Quercus*

robur L.) // Вестник ВГУ. Серия Химия. Биология. Фармация. 2003. № 2. С. 136–141.

Кисурин-Евгеньева О.П., Сулягина О.И., Онищенко Г.Е. Биогенез микроядер // Биохимия. 2016. Т. 81. Вып. 5. С. 612–624.

Кузовлев А.Н., Ядгаров М.Я., Берикашвили Л.Б., Рябова Е.В., Гончарова Д.Д., Переходов С.Н., Лихванцев В.В. Выбор метода статистического анализа // Анестезиология и реаниматология. 2021. № 3. С. 88–93.
<https://doi.org/10.17116/anaesthesiology202103188>

Наркевич А.Н., Виноградов К.А., Гржибовский А.М. Множественные сравнения в биомедицинских исследованиях: проблемы и способы решения // Экология человека. 2020. № 10. С. 55–64.
<https://doi.org/10.33396/1728-0869-2020-10-55-64>

Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Агропромиздат, 1988. 271 с.

Прохорова И.М., Ковалева М.И., Фомичева А.Н. Генетическая токсикология: лабораторный практикум. Ярославль: ЯрГУ, 2005. 132 с.

Прохорова И.М., Ковалева М.И., Фомичева А.М. Оценка митотоксического и мутагенного действия факторов окружающей среды: метод. указания. Ярославль: ЯрГУ, 2003. 140 с.

Синовец С.Ю., Пяткова С.В., Козьмин Г.В. Экспериментальное обоснование использования аллиум-теста в радиоэкологическом мониторинге // Известия вузов. 2009. № 1. С. 32–38.

Удалова А.А., Пяткова С.В., Гераськин С.А., Киселев С.М., Ахромеев С.В. Оценка цито- и генотоксичности подземных вод, отобранных на промплощадке Дальневосточного центра по обращению с радиоактивными отходами // Радиационная биология. Радиоэкология. 2016. Т. 56. № 2. С. 208–219.
<https://doi.org/10.7868/S0869803116020132>

Цховребова Л.В., Агаджанян А.В., Македонов Г.П. Эффект радиоадаптивного ответа после воздействия рентгеновского излучения и гамма-квантов на лимфоциты периферической крови здоровых доноров // Auditorium. Электронный научный журнал Курского государственного университета. 2017. № 2 (14).

Barberio A., Voltolini J.C., Mello M.L.S. Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test // Ecotoxicology. 2011. V 20. P. 927–935.
<https://doi.org/10.1007/s10646-011-0602-8>

Belyavskaya N.A. Biological effects due to weak magnetic field on plants // Advances in Space Research. 2004. V. 34. № 7. P. 1566–1574.
<https://doi.org/10.1016/j.asr.2004.01.021>

Bolsunovsky A. Ya., Dementyev D.V., Trofimova E.A. Initiatkina E.M., Kladko Yu.V., Petrichenkov M.V. Cytogenetic effects of γ -radiation in onion (*Allium cepa* L.)

- seedlings // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2018. V. 481. P. 181–185.
<https://doi.org/10.1134/S1607672918040014>
- Donà M., Ventura L., Macovei A., Confalonieri M., Savio M., Giovannin A., Carbonera D., Balestrazzi A. Gamma irradiation with different dose rates induces different DNA damage responses in *Petunia x hybrida* cells // *Journal of Plant Physiology*. 2013. V. 170. P. 780–787.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.01.010>
- Evseeva T.I., Geras'kin S.A., Shuktomova I.I., Taskaev A.I. Genotoxicity and cytotoxicity assay of water sampled from the underground nuclear explosion site in the north of the Perm region (Russia) // *Journal of Environmental Radioactivity*. 2005. V. 80. P. 59–74.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2004.08.014>
- Fenech M., Morley A. Measurement of micronuclei in lymphocytes // *Mutat. Res.* 1985. № 147. P. 29–36.
[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(85\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(85)90015-9)
- Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A.T., Surrallés J., Crott J.W., Parry J., Norppa L.H., Eastmond D.A., Tucker J.D., Thomas P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells // *Mutagenesis*. 2011. V. 26. P. 125–132.
<https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>
- Fiskesjö G. The Allium test as a standard in environmental monitoring // *Hereditas*. 1985. V. 102. P. 99–112.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>
- Geras'kin S.A., Oudalova A.A., Kim J.K., Dikarev V.G., Dikareva N.S. Cytogenetic effect of low dose γ -radiation in *Hordeum vulgare* seedlings: non-linear dose–effect relationship // *Radiat Environ Biophys.* 2007. V. 46. № 1. P. 31–41.
<https://doi.org/10.1007/s00411-006-0082-z>
- Grant W.F. Chromosome aberration assays in Allium. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox program // *Mutation Research*. 1982. V. 99. P. 273–291.
[https://doi.org/10.1016/0165-1110\(82\)90046-X](https://doi.org/10.1016/0165-1110(82)90046-X)
- Goodman E.M., Sharpe P.T., Greenebaum B., Marron M.T. Pulsed magnetic fields alter the cell surface // *FEBS Lett.* 1986. V. 199. № 2. P. 275–278.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80494-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80494-x)
- Kumar A., Kaur S., Chandel S., Singh H.P., Batish D.R., Kohli R.K. Comparative cyto- and genotoxicity of 900 MHz and 1800 MHz electromagnetic field radiations in root meristems of *Allium cepa* // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2020. V. 188.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109786>
- Livshitz Y., Gafri O. Technology and equipment for industrial use of pulse magnetic fields // *Digest of Technical Papers. 12th IEEE International Pulsed Power Conference*. Cat. No. 99CH36358. 1999. V. 1. P. 475–478.
- Loeschinger M., Thumm S., Haemmerle H., Rodemann H.P. Stimulation of protein kinase A activity and induced terminal differentiation of human skin fibroblasts in culture by low-frequency electromagnetic fields // *Toxicology Letters*. 1998. V. 96–97. P. 369–376.
[https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(98\)00095-2](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(98)00095-2)
- López-Díaz B., Mercado-Sáenz S., Martínez-Morillo M., Sendra-Portero F., Ruiz-Gómez M.J. Long-term exposure to a pulsed magnetic field (1.5 mT, 25 Hz) increases genomic DNA spontaneous degradation // *Electromagnetic Biology and Medicine*. 2014. V. 33. № 3. P. 228–235.
<https://doi.org/10.3109/15368378.2013.802245>
- Olive P.L. The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation // *Radiation Research Society*. 1998. V. 150. № 5. Supplement: Madame Curie's Discovery of Radium (1898): A Commemoration by Women in Radiation Sciences (1998). P. 42–51.
- Oudalova A.A., Geras'kin S.A., Dikarev V.G., Nesterov Y.B., Dikareva N.S. Induction of chromosome aberrations is non-linear within the low dose region and depends on dose rate // *Radiation Protection Dosimetry*. 2002. V. 99. P. 245–248.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a006774>
- Priakhin E.A., Urutskoev L.I., Stiazhkina E.V., Tryapitsyna G.A., Aldibekova A.E., Peretykin A.A., Priakhin E.E., Alabin K.A., Pilia N.D., Chikovani N.Z., Voitenko D.A., Arshba R.M. Biological Detection of Physical Factors Related to the High-Current Electric Explosion of Conductors in a Vacuum // *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*. 2020. V. 84. № 11. P. 1341–1348.
<https://doi.org/10.3103/S1062873820110222>
- Panda B.B., Sahu U.K. Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the organophosphorus insecticide fen-sulfotion // *Cytobios*. 1985. V. 42. P. 147–155.
- Panagopoulos D.J., Karabarbounis A., Yakymenko I., Chrousos G.P. Human made electromagnetic fields: Ion forced oscillation and voltage gated ion channel dysfunction, oxidative stress and DNA damage (Review) // *Int J Oncol*. 2021. V. 59. № 5.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2021.5272>
- Rank J. The method of Allium anaphase-telophase chromosome aberration assay // *Ekologija Vilnius*. 2003. V. 1. P. 38–42.
- Reddy S.B., Weller J., Desjardins-Holmes D., Winters T., Keenlside L., Prato F.S., Prihoda T.J., Thomas V., Thomas A.W. Micronuclei in the blood and bone marrow cells of mice exposed to specific complex time-varying pulsed magnetic fields // *Bioelectromagnetics*. 2010. V. 31. № 6. P. 445–453.
<https://doi.org/10.1002/bem.20576>
- Sarraf M., Kataria S., Taimourya H., Oliveira Santos L., Menegatti R.D., Jain M., Ihtisham M., Liu, S. Magnetic Field (MF) Applications in Plants: An Overview // *Plants*. 2020. V. 9. P. 1139.
<https://doi.org/10.3390/plants9091139>
- Shaburova N., Krymsky V., Moghaddam A.O. Theory and practice of using pulsed electromagnetic processing of metal melts // *Materials*. 2022. V. 15.
<https://doi.org/10.3390/ma15031235>

- Singh N.P., Lai H.* 60 Hz magnetic field exposure induces DNA crosslinks in rat brain cells // *Mutat Res.* 1998. V. 400. № 1–2. P. 313–320.
[https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(98\)00017-7](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(98)00017-7)
- Sommer S., Buraczewska I., Kruszewski M.* Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions // *Int J Mol Sci.* 2020. V. 21 (4). P. 1534.
<https://doi.org/10.3390/ijms21041534>
- Tkalec M., Malarić K., Pavlica M., Pevalek-Kozlina B., Vidaković-Cifrek Z.* Effects of radiofrequency electromagnetic fields on seed germination and root meristematic cells of *Allium cepa* L. // *Mutation Research.* 2009. V. 672. № 2. P. 76–81.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.022>
- Terradas M., Martin M., Tusell L., Genesca, A.* DNA lesions sequestered in micronuclei induce a local defective damage response // *DNA Repair.* 2009. № 8. P. 1225–1234.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.07.004>
- Yalçın S., Erdem G.* Biological effects of electromagnetic fields // *African Journal of Biotechnology.* 2012. V. 11. № 17. P. 3933–3941.
<https://doi.org/10.5897/AJB11.3308>
- Wahab M.A., Podd J.V., Rapley B.I., Rowland R.E.* Elevated sister chromatid exchange frequencies in dividing human peripheral blood lymphocytes exposed to 50 Hz magnetic fields // *Bioelectromagnetics.* 2007. V. 28. № 4. P. 281–288.
<https://doi.org/10.1002/bem.20289>

Comparison of the Cytogenetic Effects of a Pulsed Magnetic Field and Gamma Radiation on Meristem Cells of Onion Seed Sprouts (*Allium cepa* L.)

A. E. Aldibekova^{1, #}, E. V. Styazhkina^{1,2}, G. A. Tryapitsyna^{1,2}, E. A. Pryakhin¹

¹Urals Research Center for Radiation Medicine, st. Vorovskogo, 68a, Chelyabinsk, 454141 Russia

²Chelyabinsk State University, st. Bratiev Kashirinykh, 129, Chelyabinsk, 454001 Russia

[#]e-mail: albinaaes@gmail.com

The effect of a pulsed magnetic field (PMF) on meristem cells of onion seedlings was compared with the effects of acute gamma irradiation using the allium test. It was found that a pulse with a carrier frequency of 1.8 MHz, a pulse repetition rate of 28 kHz, and a magnetic field induction of 75 mT per pulse leads to an increase in the mitotic index, mainly due to an increase in the proportion of cells in the prophase, an increase in the frequency of cells with chromosome aberrations in the ana-telophase and does not affect the frequency of cells with micronuclei. It has been suggested that UTI causes nonspecific oxidative stress in plant cells, accompanied by a delay in the cell cycle at the check point (G2/M) and induction of DNA damage. According to these indicators, the PMF resembles the effect of ionizing radiation in doses of 0.05–0.5 Gy.

Keywords: pulsed magnetic field, gamma irradiation, allium test, chromosomal aberrations, cell cycle, micronuclei

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ мРНК *TNFRSF12A* И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ *TNFRSF12A*+ КЛЕТОК В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ТИОАЦЕТАМИД-ИНДУЦИРОВАННОМ ФИБРОГЕНЕЗЕ

© 2024 г. Е. И. Лебедева^{*}, А. Т. Щастный^{*}, А. С. Бабенко^{**}

^{*}Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
просп. Фрунзе, 27, г. Витебск, 210009 Республика Беларусь

^{**}Белорусский государственный медицинский университет,
просп. Дзержинского, 83, корпус 15, г. Минск, 220116 Республика Беларусь

[@]E-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.12.2022 г.

После доработки 11.04.2023 г.

Принята к публикации 11.04.2023 г.

Впервые на разных стадиях фиброза в печени крыс детально изучены экспрессия мРНК *TNFRSF12A* и распределение *TNFRSF12A*+ клеток. В условиях физиологической нормы уровень экспрессии мРНК *TNFRSF12A* составил 0.224 (95% ДИ: 0.170–0.277). При этом клетки, экспрессирующие маркер *TNFRSF12A* практически отсутствовали. На стадии мостовидного фиброза установлен первый пик роста мРНК *TNFRSF12A* ($p = 0.000$) и площади *TNFRSF12A*+ клеток ($p = 0.000$). Второй пик подъема показателей ($p = 0.000$) выявлен в период процесса трансформации фиброза в цирроз печени, а на стадии неполного цирроза отметили резкое их падение. Со стадии достоверного цирроза снова наблюдали рост экспрессии мРНК *TNFRSF12A* и площади *TNFRSF12A*+ клеток. Иммуногистохимическим методом выявлены две группы *TNFRSF12A*+ клеток. В синусоидных капиллярах *TNFRSF12A*+ клетки имели форму близкую к плоской и напоминали эндотелиоциты, а в фиброзной соединительной ткани они были округлой формы. Количество α -SMA+ клеток до периода наступления достоверного цирроза увеличивалось плавно ($p = 0.000$), а затем происходило резкое их увеличение ($p = 0.000$).

Ключевые слова: крысы, фиброгенез печени, мРНК *TNFRSF12A*, *TNFRSF12A*+ и α -SMA+ клетки

DOI: 10.31857/S1026347024010023, **EDN:** LWFVIA

Хроническое поражение печени различной этиологии часто приводит к ее фиброзу и циррозу (Cai *et al.*, 2021; Breit *et al.*, 2021; Odagiri *et al.*, 2021). Эти патологические процессы опосредованы сложной сетью молекулярных каскадов ряда сигнальных путей (TWEAK/Fn14, Notch, WNT/ β -catenin, Hippo и др.), которые интенсивно исследуются и идентифицируются (Wilhelm *et al.*, 2016; Esmail *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2021; Dwyer *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022). К настоящему времени получен значительный объем данных о лигандах, рецепторах и генах, участвующих в формировании цирроза печени. Однако патогенез фиброза печени еще далек от полного понимания. Сообщается о необходимости проведения исследований с использованием экспериментальных животных для раскрытия клеточных, молекулярно-генетических, эпигенетических механизмов и разработки эффективных терапевтических инструментов регуляции гомеостаза при лечении

фиброза печени (Weiskirchen, 2020; Kisseleva, Brenner, 2021; Cheng *et al.*, 2021).

В мировой научной литературе имеются сведения о том, что сигнальный путь TWEAK/Fn14 может стимулировать пролиферацию фибробластов, индуцировать синтез компонентов межклеточного вещества соединительной ткани и регулировать секрецию профибротических медиаторов, тем самым поддерживая фиброгенез в таких органах, как сердце, почки, печень и мышцы. Также показано, что TWEAK/Fn14 способен регулировать ангиогенез, контролировать пролиферацию, дифференцировку, миграцию и апоптоз клеток. При поражении органов активация TWEAK/Fn14 увеличивает экспрессию провоспалительных цитокинов, запускает иммунный ответ и нарушает регуляцию процесса восстановления. Тем не менее в отношении функционирования данного сигнального пути много вопросов остается без ответа (Chen *et al.*, 2012; Gomez *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021;

Wang *et al.*, 2020; Winkles, 2008; Chen *et al.*, 2021; Dwyer *et al.*, 2021).

В печени функционирование сигнального пути TWEAK/Fn14 более подробно исследовалось при регенерации органа, гепатоцеллюлярной карциноме и лишь немногочисленные работы посвящены подробному изучению его роли в фиброгенезе органа. Показано, что при фиброзе уровни экспрессии генов сигнального пути TWEAK/Fn14 повышаются. Белок TWEAK экспрессируется преимущественно макрофагами и печеночными NK-клетками. При этом авторы не уточняют, какие именно макрофаги (звездчатые макрофаги или инфильтрирующие моноциты/макрофаги) несут маркер TWEAK (Jakubowski *et al.*, 2005; Burkly *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013;).

В изученной литературе практически отсутствуют данные о связи между уровнем экспрессии мРНК *TNFRSF12A* (Fn14), белка *TNFRSF12A* (Fn14) и α -SMA клетками (активированные жиронакапливающие клетки) в ходе инициации и развития фиброза печени. А те данные, которые представлены, не позволяют подробно рассмотреть процесс фиброгенеза поэтапно, что ограничивает возможности для соответствующих выводов.

Мы предполагаем, что увеличение количества α -SMA клеток в ходе инициации и развития фиброза печени связано с изменением уровня мРНК *TNFRSF12A* и белка *TNFRSF12A*. В соответствии с вышесказанным целью настоящей работы явилось получение данных об уровне экспрессии мРНК *TNFRSF12A*, *TNFRSF12A*-позитивных клетках и α -SMA клетках на различных стадиях фиброза печени. Наряду с этим в рамках исследования была предпринята попытка оценки потенциала уровня мРНК *TNFRSF12A* и *TNFRSF12A*-позитивных клеток в качестве маркера фиброза печени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В рамках настоящей работы использовали международные термины по цитологии и гистологии (Банин, Быков, 2009), а при описании генов применяли название терминов, принятые в Guidelines for Nomenclature of Genes, Genetic Markers, Alleles, and Mutations in Mouse and Rat (<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>).

Экспериментальное исследование выполнено на 117 крысах-самцах Wistar весом от 190–210 г. Фиброз и цирроз печени у животных индуцировали свежеприготовленным раствором тиацетамида (ТАА), который вводили в желудок с помощью зонда в дозе 200 мг/кг массы тела животного 2 раза в неделю в течение 17 недель. Животные случайным образом были разделены на 9 групп по

12 особей в каждой: m0 – контрольная, m1 – длительность воздействия ТАА 3 нед., m2 – длительность воздействия ТАА 5 нед., m3 – длительность воздействия ТАА 7 нед., m4 – длительность воздействия ТАА 9 нед., m5 – длительность воздействия ТАА 11 нед., m6 – длительность воздействия ТАА 13 нед., m7 – длительность воздействия ТАА 15 нед., m8 – длительность воздействия ТАА 17 нед. Крысы контрольной группы получали аналогичный объем воды без ТАА. Во время эксперимента погибло 9 животных. Протокол эксперимента был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными при учреждении образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (протокол № 6 от 03.01.2019 г). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с рекомендациями Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях от 18.03.1986, Директиве Совета ЕЭС от 24.11.1986 и рекомендациям FELASA Working Group Report (1994–1996).

Забор биологического материала и пробоподготовка. Животных выводили из эксперимента согласно разделению по группам (m0–m8). Немедленно после декапитации из большой левой доли печени крыс скальпелем забирали фрагменты органа диаметром не более 5 мм. Работа проводилась при температуре +20°C с жестким соблюдением временных интервалов – манипуляции с одним животным 100–140 с. После забора образцы помещали в криопробирки и далее в жидкий азот для транспортировки и хранения непосредственно до начала процедуры выделения суммарной РНК. Гомогенизацию отобранного материала осуществляли с использованием фарфоровых ступок и пестиков в присутствии жидкого азота, не допуская размораживания ткани.

Выделение суммарной РНК. Выделение суммарной РНК из исследуемых образцов печени проводили с помощью набора реагентов “АртРНК MiniSpin” (“АртБиоТех”, Беларусь) согласно протоколу производителя. После процедуры выделения и очистки суммарную РНК элюировали с мини-колонок с помощью свободной от РНКаз milliQ воды, входящей в состав набора. Контроль качественных характеристик образцов выполняли с помощью электрофореза в агарозном геле (выборочно) без денатурирующих условий (1x TAE, 2%-й гель). Количество суммарной РНК после выделения определяли с помощью спектрофотометрии при длине волны 260 нм на приборе Specord 250 Analytic Jena, Германия.

Обратная транскрипция. Синтез кДНК проводили с использованием олиго (дТ) праймеров и набора реагентов ArtMMLV Total (“АртБиоТех”, Беларусь) в соответствии с инструкцией производителя.

Для одной реакции применяли одинаковое стартовое количество суммарной РНК — 200 нг/реакцию.

Метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). При выполнении ПЦР-РВ использовали реагенты производства компании “Праймтех”, Беларусь. Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл и содержал все необходимые компоненты в следующих концентрациях и количествах: 2 мМ хлорида магния, 0.1 мМ смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов, 500 нМ олигонуклеотидов, включая зонд для ПЦР-РВ, 1.25 ед. термостабильной Taq ДНК-полимеразы с соответствующим буферным раствором. Режим термоциклирования: +95°C — 2 мин, затем 40 циклов: +95°C — 5 с, +60°C — 45 с. Детекция по каналу FAM после каждого цикла. В работе использовали прибор CFX96touch (BioRad, США). Эффективность реакций определяли с помощью метода стандартной кривой и серий разведений концентрированных образцов кДНК с шагом в 5 раз. Критерием удовлетворительной эффективности считали не менее 95%. Все реакции проводили в трех повторностях. В каждой экспериментальной и контрольной группе все 12 образцов анализировали отдельно для получения наибольшей достоверности и учета внутригрупповой вариации, фенотипической гетерогенности уровня экспрессии генов. Для оценки относительно уровня мРНК *TNFRSF12A* использовали метод 2d^{Ct}.

Олигонуклеотиды. Выбор олигонуклеотидных праймеров и зондов проводили с помощью бесплатного онлайн-приложения Primer3 v. 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Уникальность и специфичность полученных олигонуклеотидов проверяли с помощью онлайн-сервиса Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Перечень выбранных молекулярных мишеней и кандидатов в референсные гены представлен в табл. 1.

В случае наличия нескольких вариантов мРНК перед началом дизайна проводили их выравнивание с помощью бесплатного программного пакета Ugene v.33 (UniPro, Россия). Для дизайна использовали консервативные участки последовательности мРНК (позволяющие анализировать все известные альтернативные сплайс-формы мРНК суммарно) с соблюдением правила о размещении одного или более олигонуклеотидов в месте соединения двух разных экзонов. Последовательности выбранных олигонуклеотидных праймеров и зондов представлены в табл. 2.

Нормализация данных ПЦР-РВ. В качестве референсного гена для нормализации данных ПЦР-РВ использовали *HES1*, характеризующийся наименьшим разбросом значений во всех экспериментальных группах. В предварительном исследовании (данные не приводятся) не обнаружили изменений

уровня экспрессии мРНК этого гена в ответ на экспериментальное воздействие в течение всего периода наблюдений (17 нед.). Использование *SDHA* и *HPRT1*, а также их комбинации не повышало точность оценки и не вносило принципиальных изменений в конечные расчеты.

Гистологическое и иммуногистохимическое исследования. Образцы печени диаметром 5–10 мм помещали в 10%-й раствор нейтрального формалина на фосфатном буфере и фиксировали в течение 24 ч. Затем проводили обработку фиксированного материала с последующей заливкой в парафин с использованием автомата для гистологической обработки ткани STP-120 (Thermo Fisher Scientific, Германия) и станции для заливки ткани парафином EC350 (Thermo Fisher Scientific, Германия). От каждого животного получали по одному блоку для каждого метода окраски и с помощью ротационного микротомы HM340E (MICROM, Laborgerate GmbH, Германия) изготавливали в среднем 3–4 среза толщиной 4 мкм и помещали их на предметные стекла. Для получения обзорных гистологических препаратов срезы печени окрашивали гематоксилином и эозином, а для выявления соединительной ткани — по методу Маллори в автоматическом программируемом приборе для цитологических и гистологических исследований (HMS70, Thermo Fisher Scientific, Германия).

Иммуногистохимическое исследование проводили на депарафинизированных срезах (Коржевский, 2014). Использовали моноклональные кроличьи антитела к *TNFRSF12A* (FN14, номер в каталоге NBP2–67729, Bio-Techne, США, разведение 1: 200) и моноклональные мышинные антитела к α -SMA (alpha-SMA, ACTA2, номер в каталоге E-AB-22155, Wuman Elabscience Biotechnology Incorporated Company, Китай, разведение 1:1000) в соответствии с инструкциями производителей. В качестве маркера активированных жиронакапливающих клеток применяли α -SMA, так как в настоящее время он широко признан надежным индикатором их трансдифференцировки в миофибробластоподобный (активный) фенотип и является наиболее часто используемым маркером как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях (Voutilainen *et al.*, 2020).

Для лучшей ориентации в гистологическом препарате и правильной идентификации клеток, содержащих искомый антиген, срезы докрашивали гематоксилином Майера в течение 1 мин. Для объективной интерпретации результатов для каждой исследуемой группы животных использовали положительный и отрицательный контроли. Иммуногистохимическую окраску расценивали как положительную только при отсутствии окрашивания в отрицательном контроле и, наоборот, как отрицательную при окрашивании в положительном

Таблица 1. Характеристика генов-мишеней и кандидатов в референсные гены

Название гена	Статус	Референсная последовательность мРНК	Кодируемый белок
TNFRSF12A	мишень	NM_181086.3	Член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей 12A, TNF receptor superfamily member 12A
HPRT1	кандидат в референсные гены	NM_012583.2	Гипоксантин-фосфорибозилтрансфераза, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
SDHA	кандидат в референсные гены	NM_130428.1	Субъединица А флавопротеина, входящего в комплекс сукцинатдегидрогеназы, succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A
HES1*	кандидат в референсные гены	NM_024360.4	Фактор транскрипции 1 семейства bHLH (basic helix-loop-helix), hes family bHLH transcription factor 1

Примечание. * ген HES1 использован в качестве кандидата в референсные гены, поскольку в предварительных экспериментах показал высокий уровень стабильности экспрессии, первоначально рассматривался как ген-мишень.

Таблица 2. Последовательности специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов

Название гена	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	
TNFRSF12A	Прямой	GGATGCGCAGCAGCAC
	Обратный	CAAAACCAGGGCCAGACTAA
	Зонд	FAM-CCTGCCCCACTTCAGGATGCT-BHQ1
HPRT1	Прямой	GGACAGGACTGAAAGACTTGCT
	Обратный	ACAGAGGGCCACAATGTGAT
	Зонд	FAM-CATGAAGGAGATGGGAGGCC-BHQ1
SDHA	Прямой	CCCACAGGTATCTATGGTGCT
	Обратный	TTGGCTGTTGATGAGAATGC
	Зонд	FAM-CATCACAGAAGGGTGCCGTG-BHQ1
HES1	Прямой	GAAAGATAGCTCCCGGCATT
	Обратный	CGGAGGTGCTTCACTGTTCAT
	Зонд	FAM-CCAAGCTGGAGAAGGCAGACA-BHQ1

контроле. Применяли следующие реагенты: набор 2-step plus Poly-HRP Anti Rabbit/Mouse IgG Detection System/with DAB Solution; Retrieve-All Antigen (Unmasking System Basic, США); буфер для разведения антител (BioLegend Inc., США); Tween 20 (Glenthams Life Sciences, Великобритания); PBS (Melford, Великобритания).

Морфометрический анализ. Гистологические препараты изучали с использованием компьютерных программ ImageScope Color и cellSens Standard. Определяли среднюю площадь, занимаемую TNFRSF12A-позитивными клетками

(TNFRSF12A+ клетки) в процентах к общей площади среза без учета интенсивности окраски экспрессии маркера (Guerrier *et al.*, 2014). Измерения проводили на изображениях, полученных с помощью цифровой камеры OLYMPUS XC30 (Япония) на базе микроскопа OLYMPUS BX51 (Япония) при увеличении объектива 20×. Количество α-SMA-позитивных клеток (α-SMA+ клетки) подсчитывали при увеличении объектива 40×. Анализировали не менее 3 полей зрения на каждом гистологическом срезе. Степень фиброза печени определяли согласно полуколичественной шкале Ishak K. G. (Everhart *et al.*, 2010).

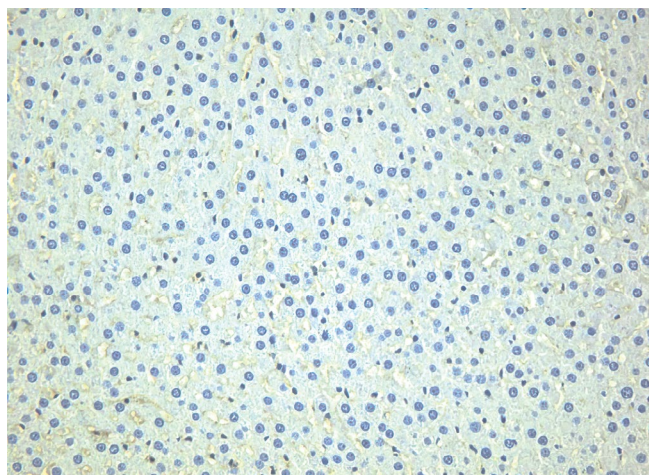


Рис. 1. Фрагмент печени крыс контрольной группы. TNFRSF12A+ клетки в паренхиме печени отсутствуют. Иммуногистохимическое выявление TNFRSF12A+ клеток и докрасивание гематоксилином Майера. Увел. об. 40×.

Статистический анализ. Результаты количественных измерений оценивали с использованием программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США), IBM SPSS Statistics 23.0 (An IBM Company, 28.0.1, США), Microsoft Office Excel (Microsoft Corp., США).

В выборках по каждой неделе эксперимента определяли нормальность частотного распределения признака по критерию Лиллиефорса. Анализ показал, что по уровню экспрессии мРНК *TNFRSF12A* в группах m2, m4, m5 и по отношению площади TNFRSF12A+ клеток к площади среза в группах m1, m2, m3, m4, m5, m6, m7 значение $p < 0.05$, следовательно, частотные распределения признака не подчинялись нормальному закону.

Количественные экспериментальные данные представлены в виде средних арифметических и их соответствующих доверительных интервалов (M (95% ДИ: $j-q$)), медианы и значения 15-го – 85-го перцентилей (Me (15%; 85%)). Об уровне статистической значимости различий изучаемых признаков в группах с нормальным распределением данных судили по t -критерию Стьюдента; в случае отличия выборок от нормального распределения использовали U -критерий Манна – Уитни. Для выявления наличия зависимости и ее силы между изучаемыми признаками использовали непараметрическую ранговую корреляцию Спирмена. Для наглядности результаты статистической обработки данных представили в виде графиков однофакторного и двухфакторного параметрического дисперсионного анализа. Так как во всех группах было одинаковое количество исследуемых признаков, допустимо использовать параметрический дисперсионный анализ (Жижин, 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

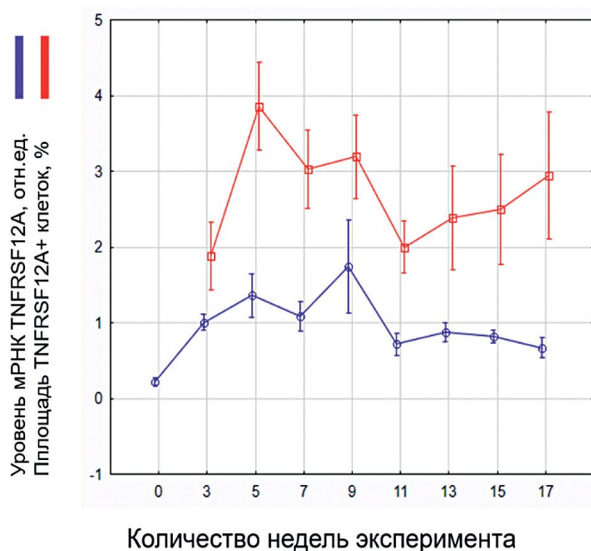
В работах авторов (Wilhelm *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2017) показано, что в условиях физиологической нормы белок *TNFRSF12A* сигнального пути TWEAK/Fn14 в клетках печени экспрессируется на весьма низком уровне. Изучение гистологических препаратов, окрашенных на выявление маркера *TNFRSF12A*, показало, что в интактной печени крыс Wistar TNFRSF12A+ клетки практически отсутствовали (рис. 1). При этом уровень экспрессии мРНК *TNFRSF12A* составил 0.224 (95% ДИ: 0.170–0.277). α -SMA+ клетки отмечались только в стенке междольковых артерий и междольковых вен. В паренхиме органа α -SMA+ клетки не наблюдались. Степень фиброза печени крыс контрольной группы по шкале Ishak K. G. соответствовала F0.

При моделировании цирроза печени на протяжении всего эксперимента анализ уровня экспрессии мРНК *TNFRSF12A* и площади TNFRSF12A+ клеток выявил их весьма сложные изменения. Для лучшей интерпретации и восприятия полученных данным вначале было принято решение разделить результаты на две большие группы (с 0 по 11 нед., с 13 по 17 нед.) и провести их анализ.

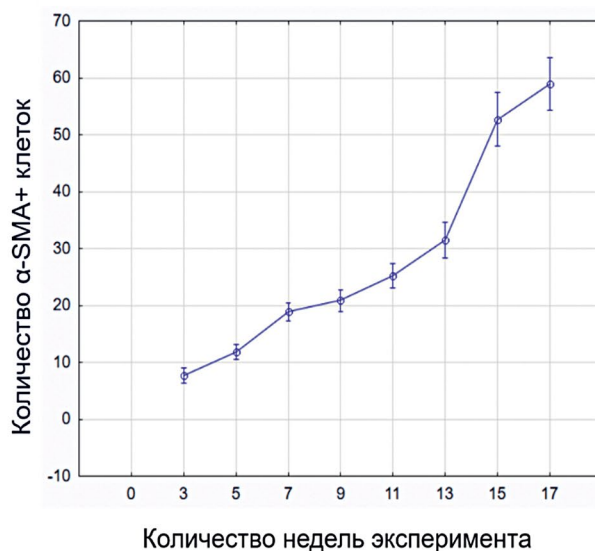
На стадии мостовидного фиброза (F3/F4, 3 нед.) выявлен первый пик роста мРНК *TNFRSF12A* и площади TNFRSF12A+ клеток (рис. 2а). Второй пик подъема показателей наблюдали в период процесса трансформации фиброза в цирроз печени (F4/F5, 9 нед.), а на стадии неполного цирроза (F5, 11 нед.) резкое их падение. При этом количество α -SMA+ клеток плавно увеличивалось (рис. 2б). Со стадии достоверного цирроза печени (F6, 13 нед.) синхронность поведения мРНК *TNFRSF12A* и площади TNFRSF12A+ клеток исчезла. Исследуемые показатели вели себя по-разному: площадь TNFRSF12A+ клеток увеличивалась, экспрессия мРНК *TNFRSF12A* росла незначительно, а при полной перестройке гистоархитектоники органа снова упала. Исчез и плавный рост количества α -SMA+ клеток. С 13 нед. эксперимента отмечено резкое увеличение их количества.

На начальном этапе эксперимента (3 нед.) в печени крыс выявили фиброзное расширение части портальных зон с отходящими от них неполными тонкими соединительнотканными септами (портальный фиброз, степень F1). Установили рост уровня мРНК *TNFRSF12A* до 1.008 (95% ДИ: 1.440–2.338). В синусоидных капиллярах отмечали TNFRSF12A+ клетки преимущественно вытянутой формы (рис. 3а). Площадь этих клеток к общей площади гистологического среза составила 2.00% (0.000; 3.000).

При изучении ИГХ-препаратов, окрашенных на α -SMA в печеночных синусоидных, наблюдали клетки преимущественно округлой формы, экспрессирующие данный маркер (рис. 3б).



а



б

Рис. 2. Представлен график дисперсионного анализа: а — динамика изменений уровня мРНК *TNFRSF12A* и отношения площади *TNFRSF12A*+ клеток к площади среза. Представлен график двухфакторного дисперсионного анализа; б — динамика изменений количества α-SMA+ клеток в течение эксперимента.

Количество этих клеток составило 7.722 (95% ДИ: 6.426–9.017).

Через 5 нед. эксперимента в печени отмечали портальный, мостовидный, местами центральнобулярный и диффузный перипеллюлярный фиброз. Его степень по шкале Ishak K. G. соответствовала F2/F3. Площадь *TNFRSF12A*+ клеток увеличилась до 4.00% (2.000; 6.000). Определялись они в печеночных синусоидах и по форме напоминали эндотелиоциты. Экспрессия мРНК *TNFRSF12A* составила 1.152 (0.683; 1.613). Количество α-SMA+ клеток было равным 11.777 (95% ДИ: 10.480–13.074). Клетки α-SMA+ округлой формы наблюдали преимущественно в печеночных синусоидах, а также в значительно меньшем количестве в портальных зонах, стенках междольковых артерий и междольковых вен.

По истечении 7 нед. эксперимента при прогрессировании токсического поражения печени и фиброза (F3/F4) уровень мРНК *TNFRSF12A* был равен 1.082 (95% ДИ: 0.886–1.277), площадь *TNFRSF12A*+ клеток снизилась до 3.00% (2.000; 5.000), а количество α-SMA+ клеток составило 18.888 (95% ДИ: 17.283–20.493).

На фоне дальнейшей интоксикации животных (9 нед.) выявлены обширные разрастания соединительной ткани вокруг портальных зон, местами с формированием единичных ложных печеночных долек — процесс трансформации фиброза печени в цирроз. Степень фиброза по шкале Ishak K. G. соответствовала F4/F5. При этом экспрессия

мРНК *TNFRSF12A* и площадь *TNFRSF12A*+ клеток изменилась незначительно по сравнению с 7 нед. эксперимента: 1.039 (0.692; 3.138) и 3.00% (1.000; 5.000) соответственно. Количество α-SMA+ клеток продолжало увеличиваться и стало равным 20.861 (95% ДИ: 18.958–22.763). Интересно отметить, что на данном сроке эксперимента α-SMA+ и *TNFRSF12A*+ клетки появились в соединительнотканых септах и их форма была округлой в отличие от *TNFRSF12A*+ клеток в печеночных синусоидах.

Последующие исследования показали, что через 11 нед. эксперимента в печени крыс наблюдали диффузную нодулярную перестройку паренхимы. Степень фиброза по шкале Ishak K. G. соответствовала F5 (неполный цирроз). Уровень мРНК *TNFRSF12A* понизился до 0.632 (0.423; 0.864), а площади *TNFRSF12A*+ клеток до 2.00% (1.000; 3.000). При этом количество α-SMA+ клеток стало еще больше — 25.250 (95% ДИ: 23.064–27.435).

Методом непараметрической ранговой корреляции Спирмена статистически значимая зависимость между мРНК *TNFRSF12A* и *TNFRSF12A*+ клетками, между мРНК *TNFRSF12A* и стадией фиброза, между *TNFRSF12A*+ клетками и стадией фиброза, между α-SMA+ клетками и стадией фиброза, мРНК *TNFRSF12A* и α-SMA+ клетками не установлена. При этом, как видно из представленных графиков (рис. 2), до стадии достоверного цирроза уровень экспрессии мРНК *TNFRSF12A* и площадь *TNFRSF12A*+ клеток реагируют весьма

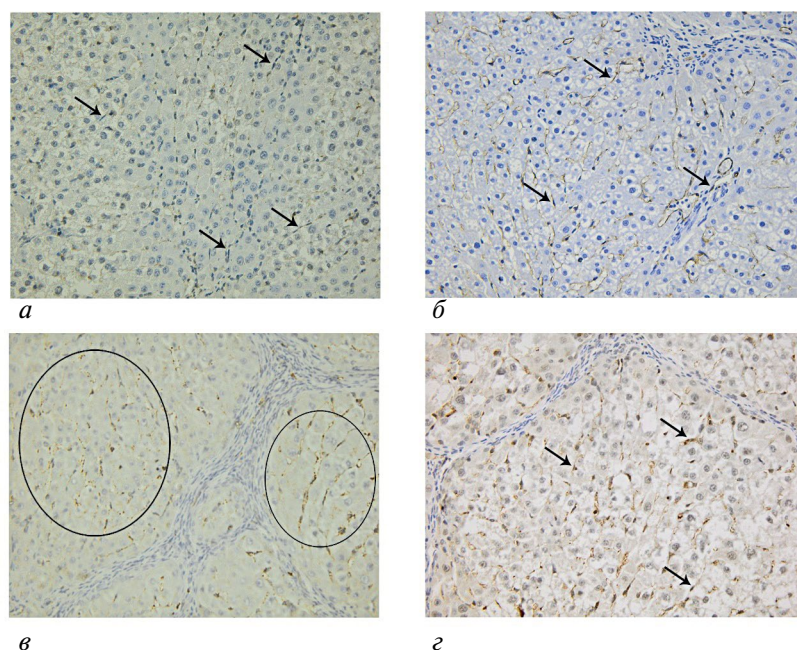


Рис. 3. Фрагменты печени крыс с индуцированным циррозом через 3 нед. (а), (б); 17 нед. (в, г) после начала эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание на *TNFRSF12A*, докраска гематоксилином Майера (а), (в). Иммуногистохимическое окрашивание на α -SMA, докраска гематоксилином Майера (б), (г). $\times 40$
TNFRSF12A⁺ клетки в синусоидных капиллярах: а – стрелки; в – выделены овальными рамками; α -SMA⁺ клетки в синусоидных капиллярах (г); б – стрелки.

схоже при фиброгенезе печени, вызванном тиоацетамидом.

На следующем этапе эксперимента (13 нед.) морфологическое исследование печени позволило установить тотальное поражение органа (достоверный цирроз, F6). Экспрессия мРНК *TNFRSF12A* была равной 0.880 (95% ДИ: 0.756–1.005), а площадь *TNFRSF12A*⁺ клеток – 2.00% (1.000; 4.000). Количество α -SMA⁺ клеток увеличилось до 31.500 (95% ДИ: 28.381–34.618). На гистологических препаратах в соединительной ткани наблюдали значительное количество α -SMA⁺ клеток округлой формы. Отмечались они и в очагах некроза гепатоцитов.

К концу эксперимента (15 нед.) установили выраженный цирроз с формированием многочисленных ложных печеночных долек. Уровень экспрессии мРНК *TNFRSF12A* изменился незначительно по сравнению с предыдущим этапом и составил 0.819 (95% ДИ: 0.732–0.905). Площадь *TNFRSF12A*⁺ клеток была равной 2.00% (1.000; 3.000). Количество α -SMA⁺ клеток выросло до 52.722 (95% ДИ: 48.067–57.377).

На терминальной стадии (17 нед.) выявили тотальное образование ложных печеночных узелков и выраженное диффузное разрастание соединительной ткани. Экспрессия мРНК *TNFRSF12A* упала до 0.672 (95% ДИ: 0.539–0.805), а площадь

TNFRSF12A⁺ клеток подросла до 2.944% (95% ДИ: 2.101–3.788). В печеночных синусоидах *TNFRSF12A*⁺ клетки имели форму близкую к плоской и напоминали эндотелиоциты (рис. 3в), а в соединительной ткани они были округлой формы. Значительное количество *TNFRSF12A*⁺ клеток выявлялось в печеночных синусоидах.

Количество α -SMA⁺ клеток через 17 нед. эксперимента составило 58.944 (95% ДИ: 54.318–63.570) (рис. 2б). Выявлялись они в стенках междольковых артерий и междольковых вен, в синусоидных капиллярах (рис. 3г), в очагах некроза гепатоцитов и в значительном количестве в соединительной ткани. Во всех структурах форма α -SMA⁺ клеток была округлой.

Рост мРНК *TNFRSF12A* и *TNFRSF12A* был отмечен в печени людей и экспериментальных животных при фиброзе (Wilhelm *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2017). Однако авторы в основном изучали функционирование сигнального пути TWEAK/Fn14 при фиброгенезе лишь в нескольких временных точках, иногда без привязки к структуре органа. Фиброз печени – это весьма динамичный процесс, сопровождающийся одновременно регенерацией органа, компенсаторно-приспособительными механизмами и постоянно меняющимся состоянием микроокружения (Rockey, Friedman, 2021; Khan, Saxena, 2021). В рамках настоящего исследования

оценивали уровень экспрессии мРНК TNFRSF12A, отношение площади TNFRSF12A+ клеток к площади среза и количества α -SMA с учетом промежуточных стадий фиброгенеза печени (в девяти временных точках эксперимента), что позволило получить новые данные.

В условиях физиологической нормы в паренхиме печени половозрелых крыс-самцов Wistar установлен уровень экспрессии мРНК TNFRSF12A отличный от нуля при отсутствии/невозможности регистрации белка TNFRSF12A. Полученные данные согласуются с результатами других исследователей (Gomez *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021). Это может быть связано с тем, что мРНК TNFRSF12A не транслируется в белок, а нарабатывается для выполнения неизвестных и неописанных в настоящее время функций. При этом вероятна трансляция в изоформы белка, детекция которых иммуногистохимическим методом не представляется возможной или ограничена особыми требованиями к антителам. Не исключено, что определенное количество мРНК все же транслируется в белок, однако его количество чрезвычайно низко и не детектируется. На наш взгляд, не лишено смысла и предположение о том, что определенный уровень мРНК TNFRSF12A поддерживается в норме постоянно и не транслируется далее в соответствующий белок до поступления определенных сигналов. Этот процесс может быть использован для быстрой реакции на изменение состояния внутри клеток, так как печень является основным органом, обеспечивающим метаболизм ксенобиотиков (лекарств, токсических веществ и др.) (Kisseleva, Brenner, 2021; Tadokoro *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022). Регуляция этих процессов может быть связана с микроРНК и пр. некодирующими РНК. Наконец, белок TNFRSF12A может транслироваться, но тут же транспортироваться в кровоток, что в дальнейшем может быть подтверждено или опровергнуто с помощью иммуноферментного анализа.

Несмотря на то что не выявлена корреляционная связь между экспрессией мРНК TNFRSF12A и TNFRSF12A+ клетками до перехода фиброза в цирроз печени, в поведении показателей прослеживается синхронность. На представленных выше графиках (рис. 2) четко наблюдаются подъемы и падения их уровней. На стадии трансформации фиброза в цирроз уровни мРНК TNFRSF12A и TNFRSF12A одновременно снизились и в дальнейшем показали различные векторы изменения.

В рамках исследования ставился вопрос о возможности объяснения перехода от фиброза к циррозу через белок TNFRSF12A или мРНК TNFRSF12A. Считаем, что белок TNFRSF12A более точно описывает стадии фиброза печени и может быть маркером фиброгенеза при проведении доклинических исследований с использованием антифибротических препаратов. Данные об уровне

мРНК (все возможные сплайс-варианты без выделения отдельных форм) пока не удается использовать для получения клинически значимых данных о стадиях фиброза печени. Однако полученные нами данные показывают, что уровень мРНК TNFRSF12A, вероятно, играет важную роль в инициации и развитии фиброза печени и должен рассматриваться как независимый фактор. Получение новых данных о значении альтернативных сплайс-форм гена и их роли в формировании ответа на различные повреждающие факторы может пролить свет на многие до сих пор не изученные стадии фиброгенеза печени.

Следует отметить, что для белка TNFRSF12A во всех исследуемых временных точках исследований (нед.) отмечен разброс значений от животного к животному. Для мРНК TNFRSF12A только на стадии трансформации фиброза в цирроз наблюдали значительный разброс признака. При изучении гистологических препаратов печени выявили, что в различных участках одного и того же среза переход от одной стадии фиброза к другой, как и прогрессирование патологических изменений, были выражены с различной степенью интенсивности. На морфологическом уровне гетерогенность проявлялась значительнее. На патогенез оказывают влияние индивидуальные особенности животных.

Выявлены две группы TNFRSF12A+ клеток, отличающиеся друг от друга по локализации и форме. Это могут быть разные клетки или стадии дифференцировки одной популяции клеток. В печеночных синусоидах TNFRSF12A+ клетки морфологически были схожи с эндотелиоцитами. Предположительно, в условиях фиброгенеза эндотелиоциты синусоидов экспрессируют TNFRSF12A. Сигнальный путь TWEAK/Fn14 направляет или каким-то образом оказывает влияние на процесс капилляризации синусоидов. Это объясняет рост мРНК TNFRSF12A до процесса трансформации фиброза в цирроз печени. Вероятно, затем вступают в работу другие клеточно-молекулярные механизмы на фоне меняющегося микроокружения. Цирроз сопровождается дискомплексацией печеночных долек, в местах некроза гепатоцитов разрастанием соединительной ткани, как следствие TNFRSF12A+ клетки синусоидных капилляров оказываются в соединительной ткани, изменяя свою форму и, вероятно, функции в зависимости от состояния ниши. Процесс изменения фенотипа и функций эндотелиоцитов печеночных синусоидов, вероятно, является основным и одним из первых инициаторов процесса активации жиронакапливающих клеток как основного источника синтеза компонентов межклеточного вещества соединительной ткани.

В работе авторов (Wilhelm *et al.*, 2016) упомянуто о том, что в культуре жиронакапливающие клетки

печени экспрессируют *TNFRSF12A* и пролиферируют в ответ на их стимуляцию TWEAK. В нашей работе мы не можем констатировать факт того, что α -SMA+ клетки экспрессируют белок TNFRSF12A. Локализация α -SMA+ и TNFRSF12A+ клеток одинаковая — синусоиды, а вот их форма разная. Некорректно сравнивать методы *in vitro* и *in vivo*, но и полностью воссоздать в пробирке естественное микроокружение невозможно. В рамках настоящего исследования до наступления достоверного цирроза количество α -SMA+ клеток увеличивалось плавно, а затем происходило резкое увеличение их количества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В печени интактных крыс установлен уровень экспрессии мРНК *TNFRSF12A* отличный от нуля при отсутствии/невозможности регистрации белка TNFRSF12A. В ходе эксперимента на стадиях мостовидного фиброза и трансформации фиброза в цирроз печени при плавном росте количества α -SMA+ клеток выявили резкие подъемы уровня экспрессии мРНК *TNFRSF12A* и площади TNFRSF12A+ клеток по сравнению с интактной группой. На стадии неполного цирроза печени отметили резкое падение уровня мРНК *TNFRSF12A* и площади TNFRSF12A+ клеток. Прогрессирующий достоверный цирроз сопровождался увеличением площади TNFRSF12A+ клеток при незначительном росте экспрессии мРНК TNFRSF12A.

Выявлены две группы TNFRSF12A+ клеток, отличающиеся друг от друга по локализации и форме. TNFRSF12A+ клетки более точно описывают стадии фиброза и могут быть использованы в качестве прогностического маркера фиброгенеза при проведении доклинических исследований антифибротических препаратов. Однако полученные нами данные показывают, что уровень мРНК TNFRSF12A, вероятно, играет важную роль в инициации и развитии фиброза печени и должен рассматриваться как независимый фактор.

Полученные результаты позволяют рассуждать о влиянии мРНК *TNFRSF12A* на процессы инициации и развития фиброза, а также на трансформацию жиронакапливающих клеток в миофибробластический фенотип и на прогрессирование фиброза печени.

ЭТИЧЕСКОЕ ОДОБРЕНИЕ

Протокол эксперимента одобрен на заседании комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными в образовательном учреждении «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (протокол от 3 января 2019 г. № 6).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований “Фундаментальные и прикладные науки — медицине” Министерства здравоохранения Республики Беларусь, задание 2.89 “Изучить роль экспрессии генов NOTCH- и TWEAK-сигнальных путей, участвующих в процессах пролиферации и дифференцировки клеток печени в норме и при ее токсическом поражении” (регистрационный номер 20190107).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы утверждают отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Банин В.В., Быков В.Л. Международные термины по цитологии и гистологии человека с официальным списком русских эквивалентов. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 272 с.
- Коржевский Д.Э. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии. СПб.: СпецЛит, 2014. 119 с.
- Жижин К.С. Медицинская статистика: учебное пособие. Ростов н/Д: Феникс, 2007. 160 с.
- Breit H.C., Block K.T., Winkel D.J., Gehweiler J.E., Henkel M.J., Weikert T., Stieltjes B., Boll D.T., Heye T.J. Evaluation of liver fibrosis and cirrhosis on the basis of quantitative T1 mapping: Are acute inflammation, age and liver volume confounding factors? // Eur. J. Radiol. 2021. № 141. P. 109789. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2021.109789>
- Burkly L.C., Michaelson J.S., Hahm K., Jakubowski A., Zheng T.S. TWEAKing tissue remodeling by a multifunctional cytokine: role of TWEAK/Fn14 pathway in health and disease // Cytokine. 2007. V. 40. № 1. P. 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.09.007>
- Cai J., Hu M., Chen Z., Ling Z.J. The roles and mechanisms of hypoxia in liver fibrosis // Transl. Med. 2021. V. 19. № 1. P. 186. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02854-x>
- Chen H.N., Wang D.J., Ren M.Y., Wang Q.L., Sui S.J. TWEAK/Fn14 promotes the proliferation and collagen synthesis of rat cardiac fibroblasts via the NF- κ B pathway // Mol. Biol. Rep. 2012. V. 39. № 8. P. 8231–41. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1671-3>
- Chen W., Liu Y., Chen J., Ma Y., Song Y., Cen Y., You M., Yang G. The Notch signaling pathway regulates macrophage polarization in liver diseases // Int. Immunopharmacol. 2021. № 99. P. 107938. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107938>
- Cheng D., Chai J., Wang H., Fu L., Peng S., Ni X. Hepatic macrophages: Key players in the development and

- progression of liver fibrosis // *Liver Int.* 2021. V. 41. № 10. P. 2279–2294.
<https://doi.org/10.1111/liv.14940>
- Dwyer B.J., Jarman E.J., Gogoi-Tiwari J., Ferreira-Gonzalez S., Boulter L., Guest R.V., Kendall T.J., Kurian D., Kilpatrick A.M., Robson A.J., O'Duibhir E., Man T.Y., Campana L., Starkey Lewis P.J., Wigmore S.J., O'lynyk J.K., Ramm G.A., Tirnitz-Parker J.E.E., Forbes S.J. TWEAK/Fn14 signalling promotes cholangiocarcinoma niche formation and progression // *J. Hepatol.* 2021. V. 74. № 4. P. 860–872.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.11.018>
- Esmail M.M., Saeed N.M., Michel H.E., El-Naga R.N. The ameliorative effect of niclosamide on bile duct ligation induced liver fibrosis via suppression of NOTCH and Wnt pathways // *Toxicol. Lett.* 2021. № 347. P. 23–35.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.04.018>
- Everhart J.E., Wright E.C., Goodman Z.D., Dienstag J.L., Hoefs J.C., Kleiner D.E., Ghany M.G., Mills A.S., Nash S.R., Govindarajan S., Rogers T.E., Greenston J.K., Brunt E.M., Bonkovsky H.L., Morishima C., Litman H.J., Group H. ALT-C. Prognostic value of Ishak fibrosis stage: findings from the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial // *Hepatology.* 2010. V. 51. № 2. P. 585–94.
<https://doi.org/10.1002/hep.23315>
- Gomez I.G., Roach A.M., Nakagawa N., Amatucci A., Johnson B.G., Dunn K., Kelly M.C., Karaca G., Zheng T.S., Szak S., Peppiatt-Wildman C.M., Burkly L.C., Duffield J.S. TWEAK-Fn14 Signaling Activates Myofibroblasts to Drive Progression of Fibrotic Kidney Disease // *J Am Soc. Nephrol.* 2016. V. 27. № 12. P. 3639–3652.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2015111227>
- Guerrier M., Attili F., Alpini G., Glaser S. Prolonged administration of secretin to normal rats increases biliary proliferation and secretin-induced ductal secretory activity // *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 2014. V. 3. № 3. P. 118–25.
<https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.04.04>
- Jakubowski A., Ambrose C., Parr M., Lincecum J.M., Wang M.Z., Zheng T.S., Browning B., Michaelson J.S., Baetscher M., Wang B., Bissell D.M., Burkly L.C. TWEAK induces liver progenitor cell proliferation // *J. Clin. Invest.* 2005. V. 115. № 9. P. 2330–40.
<https://doi.org/10.1172/JCI23486>
- Khan S., Saxena R. Regression of Hepatic Fibrosis and Evolution of Cirrhosis: A Concise Review // *Adv. Anat. Pathol.* 2021. V. 28. № 6. P. 408–414.
<https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000312>
- Kisseleva T., Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2021. V. 18. № 3. P. 151–166.
<https://doi.org/10.1038/s41575-020-00372-7>
- Li N., Hu W.J., Shi J., Xue J., Guo W.X., Zhang Y., Guan D.X., Liu S.P., Cheng Y.Q., Wu M.C., Xie D., Liu S.R., Cheng S.Q. Roles of fibroblast growth factor-inducible 14 in hepatocellular carcinoma // *Asian Pac. J. Cancer. Prev.* 2013. V. 14. № 6. P. 3509–14.
<https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.6.3509>
- Li S., Gan L., Tian Y.J., Tian Y., Fan R.Z., Huang D., Yuan F.Y., Zhang X., Lin Y., Zhu Q.F., Tang G.H., Yan X.L., Yin S. Presegetane diterpenoids from *Euphorbia sieboldiana* as a new type of anti-liver fibrosis agents that inhibit TGF- β /Smad signaling pathway // *Bioorg. Chem.* 2021. № 114. P. 105222.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105222>
- Liu Q.W., Ying Y.M., Zhou J.X., Zhang W.J., Liu Z.X., Jia B.B., Gu H.C., Zhao C.Y., Guan X.H., Deng K.Y., Xin H.B. Human amniotic mesenchymal stem cells-derived IGFBP-3, DKK-3, and DKK-1 attenuate liver fibrosis through inhibiting hepatic stellate cell activation by blocking Wnt/ β -catenin signaling pathway in mice // *Stem. Cell Res. Ther.* 2022. V. 13. № 1. P. 224.
<https://doi.org/10.1186/s13287-022-02906-z>
- Odagiri N., Matsubara T., Sato-Matsubara M., Fujii H., Enomoto M., Kawada N. Anti-fibrotic treatments for chronic liver diseases: The present and the future // *Clin. Mol. Hepatol.* 2021. V. 27. № 3. P. 413–424.
<https://doi.org/10.3350/cmh.2020.0187>
- Rockey D.C., Friedman S.L. Fibrosis Regression After Eradication of Hepatitis C Virus: From Bench to Bedside // *Gastroenterology.* 2021. V. 160. № 5. P. 1502–1520.e1.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.09.065>
- Tadokoro T., Morishita A., Masaki T. Diagnosis and Therapeutic Management of Liver Fibrosis by MicroRNA // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 15. P. 8139.
<https://doi.org/10.3390/ijms22158139>
- Voutilainen S.H., Kosola S.K., Lohi J., Mutka A., Jahnukainen T., Pakarinen M., Jalanko H. Expression of 6 Biomarkers in Liver Grafts After Pediatric Liver Transplantation: Correlations with Histology, Biochemistry, and Outcome // *Ann Transplant.* 2020. № 25. P. e925980.
<https://doi.org/10.12659/AOT.925980>
- Wang M., Xie Z., Xu J., Feng Z. TWEAK/Fn14 axis in respiratory diseases // *Clin. Chim. Acta.* 2020. № 509. P. 139–148.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.06.007>
- Weiskirchen R. Special Issue on “Cellular and Molecular Mechanisms Underlying the Pathogenesis of Hepatic Fibrosis” // *Cells.* 2020. V. 9. № 5. P. 1105.
<https://doi.org/10.3390/cells9051105>
- Wilhelm A., Shepherd E.L., Amatucci A., Munir M., Reynolds G., Humphreys E., Resheq Y., Adams D.H., Hübner S., Burkly L.C., Weston C.J., Afford S.C. Interaction of TWEAK with Fn14 leads to the progression of fibrotic liver disease by directly modulating hepatic stellate cell proliferation // *J. Pathol.* 2016. V. 239. № 1. P. 109–21.
<https://doi.org/10.1002/path.4707>
- Winkles J.A. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting // *Nat.*

- Rev. Drug. Discov. 2008. V. 7. № 5. P. 411–25. <https://doi.org/10.1038/nrd2488>
- Zhang Y., Zeng W., Xia Y. TWEAK/Fn14 axis is an important player in fibrosis // J. Cell Physiol. 2021. V. 236. № 5. P. 3304–3316. <https://doi.org/10.1002/jcp.30089>
- Zheng L., Lv Z., Gong Z., Sheng Q., Gao Z., Zhang Y., Yu S., Zhou J., Xi Z., Wang X. Fn14 hepatic progenitor cells are associated with liver fibrosis in biliary atresia // Pediatr. Surg. Int. 2017. V. 33. № 5. P. 593–599. <https://doi.org/10.1007/s00383-017-4068-5>

***TNFRSF12A* mRNA Expression and Distribution of *TNFRSF12A*⁺ Cells in Rat Liver During Thioacetamide-induced Fibrogenesis**

Elena I. Lebedeva^{1, #}, Anatoly T. Shchastniy¹, Andrei S. Babenka²

¹*Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Frunze Ave., 27, Vitebsk, 210009 Republic of Belarus*

²*Belarussian State Medical University, Dzerzhinsky ave., 83, building 15, Minsk, 220116 Republic of Belarus*

[#]*e-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru*

TNFRSF12A mRNA expression and distribution of *TNFRSF12A*⁺ cells were studied in detail for the first time at different stages of fibrosis in rat liver. Under physiological conditions, the expression level of *TNFRSF12A* mRNA was 0.224 (95% CI: 0.170–0.277). At the same time, cells expressing the *TNFRSF12A* marker were practically absent. In bridging fibrosis, the first peak of *TNFRSF12A* mRNA growth ($p = 0.000$) and an increase in the area of *TNFRSF12A*⁺ cells ($p = 0.000$) was established. The second peak ($p = 0.000$) was detected during the process of transformation of fibrosis into cirrhosis. At the stage of incomplete cirrhosis, a sharp drop was noted. A subsequent increase in the expression of *TNFRSF12A* mRNA and the area of *TNFRSF12A*⁺ cells was observed from the stage of significant cirrhosis. Immunohistochemical method revealed two groups of *TNFRSF12A*⁺ cells. In the sinusoidal capillaries *TNFRSF12A*⁺, the cells had a shape close to flat and resembled endotheliocytes, while in the fibrous connective tissue they were rounded. The number of α -SMA⁺ cells increased gradually ($p = 0.000$) before the onset of significant cirrhosis, and then there was a sharp increase ($p = 0.000$).

Keywords: rats, liver fibrogenesis, *TNFRSF12A* mRNA, *TNFRSF12A*⁺ cells, α -SMA⁺ cells

ЛИПИДКОРРЕГИРУЮЩЕЕ И АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА ИЗ МОРСКОЙ КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ *AHNFELTIA TOBUCHIENSIS* В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОЖИРОВОЙ ДИЕТЫ

© 2024 г. В. Г. Спрыгин*, Н. Ф. Кушнерова*, С. Е. Фоменко*, Е. С. Другова*,
Л. Н. Лесникова*, В. Ю. Мерзляков*

*Тихоокеанский океанологический институт им. В. И. Ильичева ДВО РАН,
Балтийская ул., 43, Владивосток, 690041 Россия

*E-mail: vgs2006@mail.ru

Поступила в редакцию 26.12.2022 г.

После доработки 05.04.2023 г.

Принята к публикации 05.04.2023 г.

Исследовано влияние липидного комплекса, выделенного из таллома морской красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis* (ЛКА), на биохимические показатели крови и печени крыс при высокожировой диете. Показано, что применение ЛКА оказывало выраженный липидкорректирующий и антиоксидантный эффект, который превосходил таковой у препарата сравнения “Омега 3-6-9” по способности восстанавливать показатели липидного обмена, соотношения липопротеиновых фракций и эндогенной системы антиоксидантной защиты, препятствовать развитию жирового гепатоза. Липидкорректирующий и антиоксидантный эффект ЛКА обусловлен действием полиненасыщенных жирных кислот семейства n-3, в частности эйкозапентаеновой кислоты, входящих в структуру фосфолипидов и гликолипидов морского происхождения и которые составляют основную часть исследуемого липидного комплекса.

Ключевые слова: *Ahnfeltia tobuchiensis*, морские липиды, n-3 ПНЖК, липидный обмен, антиоксидантная система, дислипидемия, высокожировая диета

DOI: 10.31857/S1026347024010035, **EDN:** LVRWYI

Рацион современного человека характеризуется избыточным потреблением животного жира с высоким содержанием холестерина (ХС), что способствует развитию дислипидемии с последствиями в форме ожирения (Öngün Yılmaz, 2018). Обусловленные этим патологии, такие как ишемическая болезнь сердца, инсульт, гипертония, неалкогольный стеатогепатит и цирроз печени, стали серьезной социально-экономической проблемой.

Основными средствами, применяемыми для решения данной проблемы, являются синтетические липид-снижающие препараты – статины. Кроме этого, известны препараты, относящиеся к группе веществ, препятствующих реабсорбции желчных кислот, фактора регулирования гомеостаза плазменного ХС. Также для коррекции липидного обмена, и, в частности, для снижения уровня триацилглицеридов (ТАГ) и повышения концентрации липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), применяются фибраты. Основным недостатком перечисленных медикаментозных гиподислипидемических средств является их высокая стоимость и наличие

в ряде случаев противопоказаний. При их длительном применении, особенно в больших дозах, они способны вызывать ряд достаточно серьезных неблагоприятных побочных эффектов (Дядык и др., 2018). В связи с этим актуальным представляется поиск альтернативных средств природного происхождения, лишенных перечисленных недостатков. Перспективными в этом отношении являются биологически активные комплексы из морского сырья, которые стали предметом исследований в области борьбы с ожирением и сопутствующих дислипидемии заболеваний. К таковым относятся липидные комплексы из морских гидробионтов, содержащие полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) семейства n-3.

Экспериментальные исследования показали, что добавление n-3 в диету играет значимую роль в предотвращении атеросклероза (Torres *et al.*, 2015). При этом в отличие от статинов n-3 ПНЖК способны влиять на ряд ключевых клеточных процессов, связанных с развитием атеросклероза, включая снижение интенсивности миграции

моноцитов и их адгезию на эндотелиальных клетках, ингибирование процесса поглощения макрофагами модифицированных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и подавление миграции гладкомышечных клеток, изменяя соотношение $n-6/n-3$ жирных кислот в фосфолипидах мембран в сторону его снижения (Ramji, 2019). Указанные свойства позволяют использовать комплексы морских гидробионтов, богатых $n-3$ ПНЖК, для профилактики и лечения дислипидемий разного характера. Высокий интерес в этом плане представляют бентосные формы гидробионтов, а именно различные виды морских водорослей, которые являются первичными продуцентами $n-3$ ПНЖК в пищевой цепи морских организмов (Mišurcová *et al.*, 2011). Липидные комплексы, выделенные из ряда водорослей, в значительных количествах содержат эссенциальные фосфолипиды (ФЛ) и гликолипиды (ГЛ), богатые ПНЖК (Susanto *et al.*, 2019). При этом некоторые препараты, такие как комплекс липидов из микроводоросли вида *Schizochytrium*, оказывают ингибирующее действие на ГМГ-КоА-редуктазу, снижая уровень биосинтеза холестерина (Chen *et al.*, 2011). Липидкорректирующее действие липидного экстракта *Schizochytrium* по своей эффективности снижать уровень ТАГ и ХС было не менее эффективным, чем выделенного из рыб (Komprda *et al.*, 2015).

Было показано, что на ранней стадии и для профилактики сердечно-сосудистых патологий эффективно применение докозагексаеновой (ДГК) кислоты для увеличения холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) (Bernstein *et al.*, 2012). Опубликованы экспериментальные исследования, в которых изучалось гиполлипидемическое действие липидных экстрактов из бурой водоросли *Sargassum pallidum*, зеленой водоросли *Ulva fenestrata* и морской травы *Zostera marina* в условиях экспериментальной гиперлипидемии, вызванной однократным введением Тритона-1339 (Кривошапко и др., 2012). Также липидкорректирующим свойством обладает липидный экстракт, полученный методом спиртовой экстракции измельченной сухой бурой водоросли ламинарии японской (*Laminaria japonica*) (Кушнерова, 2018). К таким средствам следует отнести и липидный комплекс из таллома морской красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis* (ЛКА). Известно, что морские красные водоросли характеризуются высоким содержанием эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) (Хотимченко, 2004), которая является ключевым компонентом комплексов морских $n-3$ ПНЖК. ЭПК выступает одним из основных носителей биологических эффектов $n-3$ кислот, обуславливающих их эффективность при коррекции нарушений липидного обмена. Это предполагает высокую фармакологическую активность липидов красных водорослей, и в частности их липидкорректирующее действие.

Химический состав ЛКА был нами описан ранее (Фоменко и др., 2019). Жирнокислотный состав ЛКА содержит высокий процент эйкозапентаеновой (20.20%) и арахидоновой (26.24%) кислот, что является характерной отличительной особенностью красных водорослей (Хотимченко, 2004). Необходимо отметить заметное содержание мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК) семейства $n-9$ — олеиновой и пальмитолеиновой кислот (22.6%), которые играют важную роль в нормализации липидного обмена (Johnson, Bradford, 2014). Соотношение арахидоновой и эйкозапентаеновой кислот, или $n-6/n-3$, в ЛКА составляло 1.3, что, как показывают данные литературы, является важным показателем, отражающим липидкорректирующий потенциал липидного комплекса и при величине данного коэффициента меньше 4 можно говорить об эффективности применения их для нормализации показателей липидного обмена и предотвращения развития сердечно-сосудистых патологий (Liu *et al.*, 2016). При этом данные о красных водорослях как об источнике липидов с липидкорректирующими свойствами, в частности относящихся к роду *Ahnfeltia*, весьма ограничены. Таким образом, представляется актуальным расширение знаний о биологической активности липидной фракции промысловой морской красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kanno et Matsubara) Makienko, распространенной в морях Дальнего Востока (Подкорытова и др., 2019), которая ранее не исследовалась в данном аспекте.

Целью настоящей работы явилось изучение липидкорректирующих свойств комплекса липидов, выделенного из таллома морской красной водоросли *A. tobuchiensis* (Kanno et Matsubara) Makienko в условиях гиперхолестеринемического рациона с жировой нагрузкой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы водоросли *A. tobuchiensis* собирали в августе — сентябре 2021 г. в заливе Петра Великого Японского моря (пролив Старка, о. Попова). Выборка водорослей составляла 100 талломов. Слоевища после сбора на базе лаборатории станции МЭС «о. Попова» очищали от эпифитов и донного бентоса, промывали сначала морской, затем дистиллированной водой. После этого сырье отжимали и транспортировали в лабораторию. Далее водоросли погружали в кипящую воду на 2 мин для инактивации ферментов. Затем водоросли сушили до остаточной влажности ~40% и помещали в морозильную камеру (-80°C) на 2 часа для повышения хрупкости, после чего измельчали с помощью лабораторной мельницы до размеров частиц ~1 мм. Липиды экстрагировали методом Блайя и Даера (Bligh, Dyer, 1959). Один килограмм измельченной водоросли экстрагировали 1.5 л смеси

хлороформ: этанол (1:2), тщательно перемешивали и оставляли на 2 часа, далее добавляли 0.5 л хлороформа и после тщательного перемешивания добавляли 0.5 л воды. Далее экстракт отделяли и отстаивали для разделения фаз. Нижнюю фазу, содержащую липиды, упаривали на ротаторном испарителе (Type 349/2, Unipan, Poland) ($T < 37^{\circ}\text{C}$) до отсутствия запаха хлороформа. Полученный липидный экстракт представлял собой маслообразную массу зелено-коричневого цвета. Выход липидов составил 2.2% от массы водоросли в пересчете на суховоздушное сырье. Содержание общих липидов определяли весовым методом.

Стандартизацию липидного комплекса *A. to-buchiensis* проводили по сумме метаболически активных фракций (сумма ГЛ и ФЛ), являющихся основным источником ПНЖК, которая составила 55% (8.6 мг/г сухой ткани). Острую токсичность ЛКА определяли по методу Кербера (Фисенко, 2000), которая составила более 2000 мг/кг, что позволяет отнести полученную субстанцию к 4 классу токсичности (малоопасные).

Эксперимент проводили на беспородных белых крысах-самцах массой тела 146 ± 3 г, полученных из питомника филиала “Столбовая” ФГБУН “Научный центр биомедицинских технологий” ФМБА России. Исследования на животных выполнены в соответствии с приказом Минздравсоцразвития России от 01.04.2016 № 199н “Об утверждении Правил лабораторной практики” и требованиями ГОСТ Р 53434–2009 “Принципы надлежащей лабораторной практики”. Животные были адаптированы в виварии в течение 7 суток до начала эксперимента. Во время этого периода осуществляли ежедневный осмотр внешнего состояния крыс. В эксперимент были взяты животные без признаков отклонений в состоянии здоровья. Животных содержали по 1 особи в индивидуальных пластиковых клетках на подстилке из опилок при $20\text{--}22^{\circ}\text{C}$ и режиме освещения 12/12 ч. Животные получали питьевую воду без ограничений и корм ежедневно в одно и то же время в режиме свободного доступа. После адаптации крыс произвольно распределяли на интактных (контроль), потреблявших на протяжении всего эксперимента стандартный общевиварный рацион, и крыс, у которых моделировали алиментарную дислипидемию. Развитие алиментарной дислипидемии осуществляли кормлением животных высокожировой диетой (ВЖД) в течение 30 суток, состоящей из базового стандартного рациона с добавлением 2% ХС и 20% говяжьего сала от общего состава рациона (Рыженков и др., 2012). Опытной группе крыс в ВЖД добавляли ЛКА в дозе 1 г/кг массы животного в пересчете на общие липиды (Новгородцева и др., 2010), что соответствовало 0.6 г/кг метаболически активной фракции.

В качестве препарата сравнения использовали коммерческий комплекс “Супер Омега 3-6-9”

(далее — Омега), содержащий смесь насыщенных (20%), моновенасыщенных (20%) и полиненасыщенных (60%) жиров, включающих комплекс ПНЖК семейств n-3 (6% ЭПК (n-3), 3% ДГК (n-3), 8% гамма-линоленовой (n-6) (ГЛК) кислот) и МНЖК семейства n-9 (3% олеиновой (n-9) кислоты). Животным в группе сравнения в диету вводили комплекс Омега в дозе 1 г/кг массы тела, что соответствует 0.6 г/кг этиловых эфиров ПНЖК и сопоставимо с дозой метаболически активной фракции ЛКА. Выбор в качестве препарата сравнения липидного комплекса “Супер Омега-3-6-9” связан со сходным набором семейств n-6 и n-3 ПНЖК и n-9 МНЖК, что и в исследуемом ЛКА, и, соответственно, предполагаемым механизмом действия.

Животные были разделены на следующие группы по 10 крыс в каждой: 1 группа — контроль (интактные, стандартный базовый рацион), 2 группа — ВЖД, 3 группа — ВЖД + ЛКА, 4 группа — ВЖД + + Омега. Животных выводили из эксперимента декапитацией под легким эфирным наркозом с соблюдением “Правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” (Страсбург, 1986). Протокол эксперимента был одобрен Комиссией по вопросам этики Тихоокеанского океанологического института им. В. И. Ильичева ДВО РАН (протокол № 16 от 15.04.2021 г.).

Оценку эффективности исследованных препаратов проводили по их влиянию на весовые характеристики (массу тела, массу печени) и биохимические показатели печени и плазмы крови. В плазме крови определяли уровень ХС, ХС-ЛПНП, ХС-ЛПВП и ТАГ, используя биохимические наборы реактивов компании «Ольвекс Диагностикум» (Россия). Экстракты общих липидов из плазмы крови и ткани печени готовили по методу Фольча (Folch *et al.*, 1957).

Анализ состава нейтральных липидов (НЛ) печени проводили методом микротонкослойной хроматографии (ТСХ) на стеклянных пластинках 6×6 см с силикагелем марки “КСК”. Суспензию силикагеля и пластинки готовили по методу (Svetashev, Vaskovsky, 1972). Фракционное разделение НЛ осуществляли методом Амента (Amenta, 1964). Использовали системы растворителей гексан: серный эфир: уксусная кислота в соотношении 90:10:1 об/об. Идентификацию пятен НЛ (холестерина, свободных жирных кислот, триацилглицеринов) на ТСХ проводили с помощью очищенных препаратов отечественного производства (Реахим, Россия). Содержание отдельных фракций выражали в процентах от общей суммы НЛ.

Состояние антиоксидантной системы оценивали по уровню антирадикальной активности (АРА) плазмы крови в отношении алкил-пероксильных

радикалов (Bartosz *et al.*, 1998), уровню малонового диальдегида (МДА) (Buege, Aust, 1978), ферментов глутатионного звена — глутатионредуктазы (ГР) (Goldberg, Spooner, 1983) и глутатионпероксидазы (ГП) (Burk *et al.*, 1980) в плазме крови, а также по уровню восстановленного глутатиона (Г-SH) (Карпищенко, 2013) и активности супероксиддисмутазы (СОД) (Paoletti *et al.*, 1986) в печени. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда (Bradford, 1976).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Instat 3.0 (Graph Pad Software Inc. USA, 2005), включающего функцию проверки соответствия выборки закону нормального распределения. Для определения статистической значимости различий для межгрупповых сравнений в зависимости от параметров распределения использовали параметрический t-тест множественных сравнений Даннета или непараметрический U-критерий Манна — Уитни, а также t-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Длительное употребление пищи с высоким содержанием жиров (высокожировая диета) вызвало развитие у крыс алиментарной дислипидемии, которая характеризовалась высоким уровнем ТАГ, ХС, ХС-ЛПНП и низким уровнем ХС-ЛПВП. Для проведения исследований с целью оценки липид-корректирующего действия различных препаратов широко используется модель ВЖД, которая вызывает устойчивую дислипидемию и развитие ожирения (Sirichaiwetchakoon *et al.*, 2020). ВЖД в течение 30 дней сопровождалась увеличением массы животных на 29% ($p < 0.001$), что составляло 185 ± 4 г по сравнению с 143 ± 3 г в контроле при одновременном увеличении удельной массы печени на 72% (7.39 ± 0.32 г/100 г массы тела против 4.30 ± 0.12 г/100 г массы тела в контроле; $p < 0.001$). При визуальном контроле в печени отмечалась сплошная зернистость жировых включений, то есть сформировался выраженный жировой гепатоз.

Биохимические показатели липидного обмена в плазме крови у экспериментальных животных в условиях ВЖД свидетельствовали о развитии выраженной дислипидемии. Так, количество общих липидов в плазме крови увеличилось на 36% ($p < 0.001$), что составляло 6.21 ± 0.19 против 4.56 ± 0.21 г/л у контрольных животных. Отмечали повышение уровня ХС на 55% ($p < 0.05$), значение ТАГ возросло более чем в 2.5 раза ($p < 0.05$), изменилось также и количественное соотношение фракций липопротеинов (рис. 1). Уровень атерогенного ХС-ЛПНП увеличился на 16% ($p < 0.05$), тогда как величина ХС-ЛПВП снизилась на 14% ($p < 0.05$). В результате расчетный коэффициент атерогенности у животных 2-й группы был выше

контрольного показателя в 2.4 раза (3.2 против 1.34 в контроле).

Исследование показателей липидного обмена в печени крыс в условиях применения ВЖД выявило значительные отклонения в содержании фракций НЛ (рис. 2). Уровень ТАГ достоверно повысился на 16% ($p < 0.05$), ХС — на 28% ($p < 0.05$), а свободных жирных кислот (СЖК) — на 19% ($p < 0.05$) по сравнению с контролем. Отмечалось снижение на 21% ($p < 0.05$) содержания эфиров холестерина (ЭХС), которые являются одним из составных компонентов при сборке липопротеинов в печени.

Анализ состояния антиоксидантной защиты организма (АОЗ) в условиях ВЖД выявил накопление в крови вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Уровень МДА повысился в 2 раза ($p < 0.001$) при одновременном снижении АРА плазмы крови на 16% ($p < 0.05$) (табл. 1).

На фоне увеличения активности свободно-радикальных процессов отмечали рассогласование показателей системы АОЗ как на уровне ферментов, так и пула низкомолекулярных антиоксидантов. Активность СОД в печени была снижена на 53% ($p < 0.001$), а содержание Г-SH на 41% ($p < 0.001$) относительно контрольной группы (табл. 1). В то же время активность ГП, катализирующей восстановление перекиси водорода (H_2O_2) и органических перекисей до воды в присутствии Г-SH, повысилась на 18% ($p < 0.001$). Активность другого фермента глутатионного звена — ГР понизилась на 13% ($p < 0.05$), что, по-видимому, обусловлено его повышенным расходом в процессе восстановления окисленного глутатиона.

При введении в высокожировую диету липидного комплекса из *A. tobuchiensis* или препарата сравнения Омега (3-я и 4-я группа соответственно) отмечалась выраженная тенденция к нормализации как весовых характеристик, так и биохимических показателей печени и крови (табл. 1, рис. 1, 2). Однако по ряду показателей были выявлены достоверные различия. Масса тела крыс 3-й группы (ЛКА) (146 ± 3 г) соответствовала контрольному уровню, при этом по сравнению с 2-й группой (ВЖД) была ниже на 29% ($p < 0.001$). Удельная масса печени (4.42 ± 0.14 г/100 г массы) также была на уровне контроля, но по сравнению с 2-й группой ниже на 40% ($p < 0.001$). В группе животных, получавших препарат Омега (4-я группа), масса тела превышала контроль на 11% (158 ± 3 г, $p < 0.01$), а при сравнении с 2-й группой (ВЖД) была ниже на 15% ($p < 0.001$). Удельная масса печени превышала таковую в контрольной группе на 29% (5.56 ± 0.33 г/100 г массы, $p < 0.01$), а по сравнению с данным показателем во 2-й группе была ниже на 25% ($p < 0.001$).

При сравнении показателей липидного обмена в плазме крови крыс 3-й (ЛКА) и 4-й (Омега) групп с таковыми во 2-й группе (ВЖД) отмечалось

Таблица 1. Показатели антиоксидантной системы в плазме крови и печени крыс при введении липидного комплекса из *A. tobuchiensis* и препарата Омега в условиях высокожировой диеты (ВЖД) ($M \pm m$)

Показатели	1 группа контроль	2 группа ВЖД	3 группа ВЖД + анфельция	4 группа ВЖД + “Омега 3-6-9”
Малоновыйдиальдегид (нмоль/мл) плазмы	3.48 ± 0.03	6.91 ± 0.09^3	$4.38 \pm 0.03^{3, в}$	$4.65 \pm 0.073^{3, в, ***}$
Антирадикальная активность (мкмоль/мл плазмы)	0.260 ± 0.015	0.219 ± 0.008^1	0.277 ± 0.010^в	$0.245 \pm 0.007^{а, *}$
Супероксиддисмутаза (ед. активности/мг белка)	659 ± 25	312 ± 14^3	642 ± 26^в	619 ± 16^в
Восстановленный глутатион (мкмоль/г печени)	6.24 ± 0.13	3.66 ± 0.17^3	$5.96 \pm 0.23^{3, в}$	$4.94 \pm 0.26^{3, в}$
Глутаионредуктаза (нмоль/мин/мл плазмы)	20.23 ± 0.48	17.28 ± 0.43^3	20.21 ± 0.39^в	$18.85 \pm 0.37^{1, а, *}$
Глутатионпероксидаза (нмоль/мин/мл плазмы)	623 ± 20	734 ± 19^2	643 ± 21^а	$573 \pm 16^{в, *}$

Примечание. Различия статистически достоверны при ¹, а, * – $p < 0.05$; ², б, ** – $p < 0.01$; ³, в, *** – $p < 0.001$. Цифры – сравнение с контролем, буквы – сравнение с 2-й группой, * – сравнение с 3-й группой. ВЖД – высокожировая диета.

снижение общих липидов на 22% ($p < 0.05$) и 14% ($p < 0.05$), что составляло 4.86 ± 0.21 и 5.19 ± 0.19 г/л соответственно. Уровень ХС был ниже на 35% ($p < 0.05$) и 24% ($p < 0.05$), а ТАГ – на 65% ($p < 0.05$) и 57% ($p < 0.05$) (рис. 1). Значение ХС-ЛПНП в плазме крови крыс 3-й группы было ниже на 13% ($p < 0.05$), а в 4-й группе – на 10% ($p < 0.05$). При этом уровень ХС-ЛПВП в плазме крови крыс 3-й группы был выше на 22% ($p < 0.05$), тогда как в 4-й группе он достоверно не отличался от такового во 2-й группе. При расчете индекса атерогенности было выявлено, что у крыс, получавших ЛКА, его значение не отличалось от контроля (1.26 против 1.34 в контроле), тогда как у животных 4-й группы (Омега) индекс атерогенности составлял 1.93. При сравнении этих значений с таковым во 2-й группе индекс атерогенности в 3-й группе (ЛКА) был ниже на 61%, в группе Омега – на 40%.

Введение ЛКА и Омега в высокожировую диету сопровождалось достоверными изменениями в количественном содержании фракций НЛ в печени крыс (рис. 2). В 3-й группе отмечалось снижение уровня ТАГ на 15% ($p < 0.05$), СЖК – на 11% ($p < 0.05$), ХС – на 22% ($p < 0.05$). В 4-й группе при введении препарата Омега снижение уровня ТАГ и ХС составило 9 и 14% ($p < 0.05$) соответственно, а содержание СЖК было выше, чем в контроле, на 11% ($p < 0.05$). Содержание ЭХС в 3-й и 4-й группах превышало таковое во 2-й группе на 24% ($p < 0.05$) и 14% ($p < 0.05$) соответственно. Следовательно, ЛКА более эффективно способствовал нормализации величин исследованных показателей НЛ в печени на фоне ВЖД.

Изменение показателей антиоксидантной системы и свободно-радикальных процессов у животных 3-й и 4-й групп характеризовалось выраженной тенденцией к восстановлению исследуемых показателей на фоне ВЖД (табл. 1). Это свидетельствует о снижении активности ПОЛ. Несмотря на то что уровень МДА в крови животных 3-й и 4-й групп превышал контрольные показатели на 26 и 34% ($p < 0.001$), в то же время по отношению ко 2-й группе он был достоверно ниже на 37 и 33% ($p < 0.001$) соответственно. На фоне снижения активности ПОЛ отмечалось повышение уровня АРА в плазме крови на 27% ($p < 0.001$) и 12% ($p < 0.05$) по сравнению с таковыми показателями во 2-й группе. Следует отметить, что у животных, получавших липидные комплексы, активность антиоксидантных ферментов СОД и ГП не имела достоверных отличий от контроля. Но по сравнению со 2-й группой активность СОД превышала таковую в 2 раза ($p < 0.001$), что также подтверждает снижение процессов ПОЛ под действием вводимых в рацион липидных комплексов. В пользу этого факта свидетельствует и более низкая, по сравнению с 2-й группой, активность ГП, которая была ниже на 12 и 21% ($p < 0.05$) соответственно. Активность ГР, фермента, ответственного за наработку пула Г-SH, в плазме крови 3-й группы находилась на уровне контрольных показателей, но по сравнению с 2-й группой превышала таковой на 20% ($p < 0.001$), тогда как активность ГР у животных 4-й группы – на 9% ($p < 0.001$). На фоне снижения уровня свободнорадикальных процессов и роста активности ГР отмечалось достоверное увеличение пула Г-SH в печени

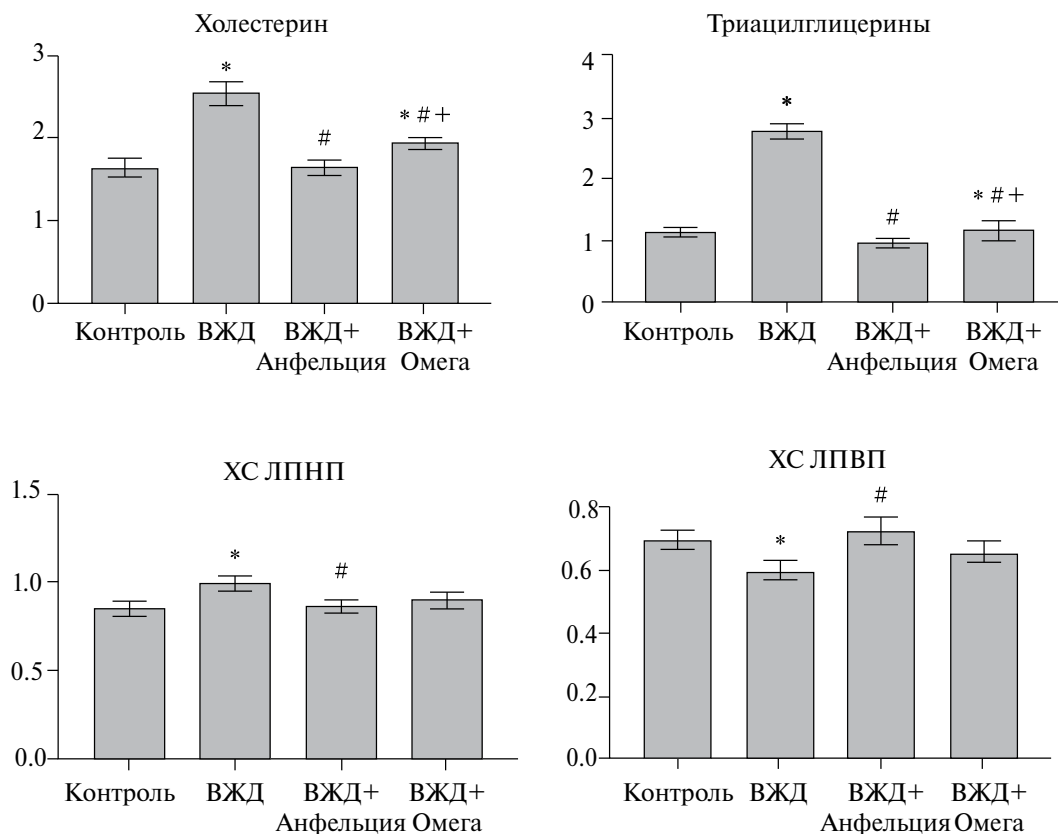


Рис. 1. Содержание фракций липидов (ммоль/л) в плазме крови крыс в условиях высокожировой диеты (ВЖД) при введении липидного комплекса из *A. tobuchiensis* и препарата Омега. Различия достоверны ($p < 0.05$) по сравнению с контролем — *, с группой ВЖД — #, с группой ВЖД + анфельция — +.

животных 3-й и 4-й групп на 63 и 35% ($p < 0.001$) соответственно по сравнению с 2-й группой. Следует отметить, что содержание Г-SH в печени животных, получавших препарат Омега, было достоверно ниже такового по отношению к контрольной группе (на 21%, $p < 0.001$), что, возможно, связано с более низкой активностью ГР у этих животных.

При анализе полученных экспериментальных данных была выявлена статистически достоверная разница между рядом соответствующих значений изученных биохимических показателей плазмы крови и печени крыс при сравнении показателей 3-й и 4-й групп (ЛКА и Омега) (рис. 1). Количество общих липидов в плазме крови при введении Омега было выше на 6.2% ($p < 0.05$), чем таковое при введении ЛКА, а также более высокий уровень ТАГ (на 23%, $p < 0.05$) и ХС (на 18%, $p < 0.05$). Данный факт, а также более низкое (на 10%) значение ХС-ЛПВП в крови животных 4-й группы обусловили более высокий индекс атерогенности (на 54%). Похожую картину наблюдали при оценке количественных показателей фракций НЛ в печени (рис. 2). Так, у животных 4-й группы уровень ХС на 10% ($p < 0.05$) превышал таковой у животных,

получавших ЛКА, а содержание ЭХС было ниже на 9% ($p < 0.05$). При этом содержание ТАГ и СЖК у животных, получавших Омега, было выше, чем в 3-й группе, на 11 и 6,3% ($p < 0.05$) соответственно. В пользу более высокой эффективности ЛКА по сравнению с Омега свидетельствуют и величины показателей эндогенной системы АОЗ. Так, в печени животных, получавших ЛКА, значение Г-SH превышало таковое у животных из группы Омега на 17% ($p < 0.01$), а активность ГР — на 7% ($p < 0.05$). Это указывает на более низкий уровень свободнорадикального окисления, в пользу чего свидетельствуют и более низкий уровень МДА (на 6%, $p < 0.05$), и более высокое значение АРА (на 12%, $p < 0.05$) в плазме крови крыс 3-й группы по сравнению с аналогичными показателями у животных группы Омега. На основании вышеизложенного следует, что ЛКА был более эффективен как липидкорректирующее и антиоксидантное средство, чем препарат Омега.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Высокожировая диета в течение 30 дней у крыс сопровождается увеличением массы тела

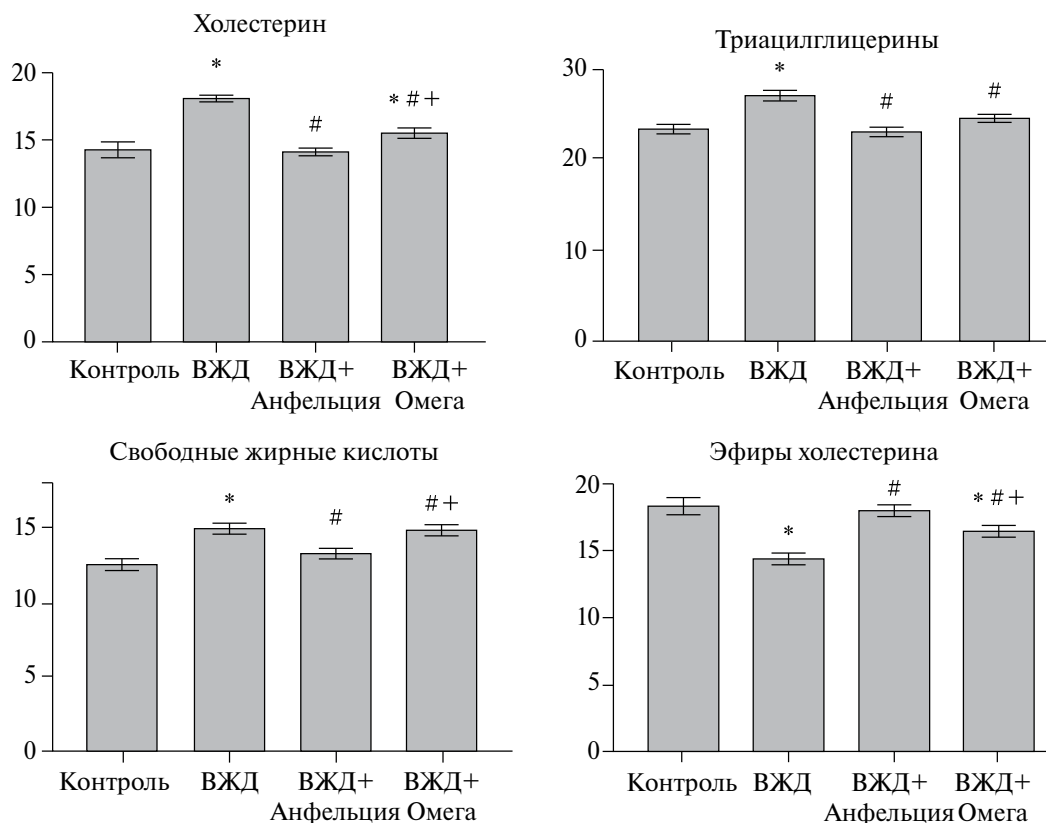


Рис. 2. Содержание фракций нейтральных липидов (% от суммы фракций) в печени крыс в условиях высокожировой диеты (ВЖД) при введении липидного комплекса из *A. tobuchiensis* и препарата Омега. Различия достоверны ($p < 0.05$) по сравнению с контролем — *, с группой ВЖД — #, с группой ВЖД + Анфельция — +.

и относительной массы печени, нарушением соотношения липидных классов в крови и печени, формированием дислипидемии. Согласно литературным данным (Новгородцева и др., 2011) при ВЖД уже через 30 дней развивается гепатостеатоз, характеризующийся жировой гипертрофией гепатоцитов за счет накопления в них избыточного количества жира. При этом в плазме крови отмечается значительный рост уровня ТАГ, ХС, ХС-ЛПНП при одновременном снижении значения ХС-ЛП-ВП. Следовательно, избыточное введение в рацион ХС и насыщенных жиров способствует повышенному образованию атерогенных ЛПНП, основного фактора риска развития атеросклероза. То есть повышенное потребление жира, богатого ТАГ, ХС и насыщенными жирными кислотами, приводит к формированию ожирения и развитию жирового гепатоза. В печени также отмечается увеличение содержания ХС, ТАГ и СЖК на фоне снижения уровня ЭХС, его основной транспортной формы в составе липопротеинов. Таким образом, гиперхолестериновый рацион с жировой нагрузкой приводит не только к жировому гепатозу, но и к накоплению в печени неэтерифицированной формы ХС. Полученные результаты указывают на нарушение

липидного обмена в плазме крови под действием ВЖД, что является фактором риска развития метаболического синдрома и сердечно-сосудистых заболеваний.

Известно, что нарушение липидного обмена вследствие ВЖД (алиментарная дислипидемия, метаболический синдром) сопровождается развитием оксидативного стресса (Francisqueti *et al.*, 2017), выражающегося в дисбалансе системы “перекисное окисление липидов — антиоксидантная защита организма” (ПОЛ-АОЗ). Накопление липидов в печени активирует молекулярные пути, связанные с окислительным стрессом и воспалением, что является важным патогенетическим последствием жирового гепатоза (Ghezlbash *et al.*, 2020). В печени увеличивается уровень МДА, одного из маркеров ПОЛ, указывающего на состояние оксидативного стресса в клетке на фоне снижения активности СОД, уровня Г-SH и активности ГР на фоне роста активности ГП. По мнению некоторых авторов, такое изменение активности ГП в условиях стресса на фоне ВЖД объясняется образованием избыточного количества продуктов пероксидации (Jimoh *et al.*, 2018), что и наблюдается в плазме крови животных на 30-е

сутки эксперимента. То есть формирующийся метаболический дисбаланс является как следствием значительного поступления жировых компонентов с диетой, так и стрессовой реакцией организма на жировую нагрузку (Noeman *et al.*, 2011). Активирующийся в условиях стресса липолиз в жировой ткани приводит к увеличению потока жирных кислот в кровь и в печень, которые являются исходными компонентами при синтезе ТАГ и ХС. В результате это приводит к их накоплению в печени и подавлению активности рецепторов ЛПНП, что в свою очередь снижает поток поступления в печень атерогенных липопротеинов и вызывает рост их концентрации в крови (Connor, Connor, 1989). Полученные нами результаты по рассогласованию компонентов и направленности изменений активности отдельных ферментов системы АОЗ в условиях ВЖД согласуются с данными, полученными ранее другими авторами (Bodur *et al.*, 2019). Все это указывает на истощение резерва адаптационных возможностей организма противостоять развивающейся патологии. Таким образом, экспериментальная модель сочетания гиперхолестеринового рациона с жировой нагрузкой в течение 30 сут сопровождалась развитием дислипидемии с характерными признаками оксидативного стресса.

Введение ЛКА и препарата сравнения Омега способствовало коррекции нарушений, вызванных применением ВЖД. Так как липидный экстракт из *A. tobuchiensis* представляет собой сложный природный комплекс, то его биологическое действие следует рассматривать как результат суммы всех его компонентов. При этом следует отметить, что активным началом липидных комплексов из морских гидробионтов считаются входящие в них ПНЖК семейства n-3, и в частности ЭПК, которая является доминирующей в исследованных нами препаратах. Ранее было показано, что добавка ЭПК в диету в условиях жировой нагрузки способствует нормализации содержания ТАГ и ХС как в плазме крови, так и в печени крыс (Hirotani *et al.*, 2015), что согласуется с полученными нами данными. В ряде исследований было показано, что n-3 ПНЖК напрямую ингибируют такие ферменты, как ацетил-КоА-карбоксилаза, гормончувствительная липаза и диацилглицерол-ацетилтрансфераза, которые участвуют в биосинтезе жирных кислот, биосинтезе ТАГ и их мобилизации (Shibabaw, 2021). Также нормализацию показателей липидного профиля под действием ПНЖК связывают с повышенным бета-окислением жирных кислот в печени (Yanagita, Nagao, 2008). Снижение уровня атерогенных ЛПНП под действием исследованных липидных комплексов может быть следствием как снижения доступности ТАГ в печени для сбора липопротеинов очень низкой плотности, предшественников ЛПНП (Shibabaw, 2021), так и активации рецепторов ЛПНП в печени вследствие снижения уровней

ТАГ и ХС по принципу обратной связи (Connor, Connor, 1989). Нормализация соотношения фракций ЛПНП и ЛПВП на фоне снижения уровня ХС в крови и соответствующее уменьшение индекса атерогенности, которое мы наблюдали при введении в ВЖД липидных комплексов, по нашему мнению, обусловлено входящими в их состав ПНЖК семейства n-3, в частности ЭПК. Так, известно, что снижение уровня ХС в крови может быть результатом, с одной стороны, снижения активности ГМГ-КоА-редуктазы в условиях модификации мембран гепатоцитов ЭПК (Murthy *et al.*, 1988), а с другой — результатом непосредственного увеличения количества ЛПВП в крови (Balk *et al.*, 2006). Также известно, что ПНЖК n-3, модифицируя ЛПВП, повышают их сродство к ХС, что приводит к росту обратного транспорта ХС в печень (Burillo *et al.*, 2012).

Липидный комплекс анфельции и препарат Омега проявляли выраженное антиоксидантное действие на фоне развития оксидативного стресса в условиях ВЖД. Известно, что ПНЖК семейства n-3, и, в частности ЭПК, являются эффективными антиоксидантами прямого действия, способными поглощать пероксид-радикалы (Richard *et al.*, 2008), что подтверждалось выявленным нами ростом АРА плазмы крови и снижением вторичных продуктов ПОЛ. При этом показано, что n-3 кислоты активируют индукцию СОД (Garrel *et al.*, 2012), восстанавливают активность ГР (Refaat *et al.*, 2022) и пул низкомолекулярных антиоксидантов, таких как Г-SH (Patten *et al.*, 2013), что мы и наблюдали при анализе полученных результатов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из полученных результатов следует, что комплекс липидов из морской красной водоросли *A. tobuchiensis*, содержащий метаболически активную фракцию морских фосфо- и гликолипидов с высоким содержанием ПНЖК семейства n-3, и в частности эйкозапентаеновой кислоты, обладает выраженным липидкорректирующим и антиоксидантным эффектом в условиях высокожировой диеты. Метаболические изменения при использовании липидного комплекса *A. tobuchiensis* и препарата Омега способствуют увеличению ХС-ЛПВП и снижению уровня атерогенности в плазме крови, а также нормализации количественного содержания фракций НЛ в печени. Способность экзогенных «морских» липидов включаться в метаболизм предполагает их активное влияние на большинство жизненно важных процессов. Минимизируются последствия оксидативного стресса, что выражается в восстановлении параметров системы АОЗ, включая нормализацию активности СОД, ГП, ГР и сохранение пула Г-SH, а также в снижении уровня перекисного окисления липидов и восстановлении АРА плазмы крови.

Исследуемый комплекс липидов из анфельции не только не уступает по своей эффективности эталонному ПНЖК комплексу “Омега 3-6-9”, но и превосходит его по способности нормализовать метаболические показатели липидного обмена в крови и основных фракций НЛ в печени и способности организма противостоять факторам оксидативного стресса в условиях высокожировой нагрузки и формирования дислипидемии. По мнению авторов, более высокая биологическая активность у липидного комплекса *A. tobuchiensis* по сравнению с “Омега-3-6-9” объясняется как более широким спектром ПНЖК семейства n-3, так и формой их содержания в виде “морских” фосфо- и гликолипидов, которая является более эффективной по сравнению с этиловыми эфирами жирных кислот в составе “Омега 3-6-9”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № 0211-2021-0014 “Эколого-биохимические процессы в морских экосистемах: роль природных и антропогенных факторов” (№ государственной регистрации 121-21500052-9).

ЭТИЧЕСКОЕ ОДОБРЕНИЕ И СОГЛАСИЕ НА УЧАСТИЕ

Исследования на животных выполнены в соответствии с приказом Минздрава России от 01.04.2016 № 199н “Об утверждении Правил лабораторной практики” и требованиями ГОСТ Р 53434-2009 “Принципы надлежащей лабораторной практики”. Исследование одобрено этической комиссией Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичева ДВО РАН (протокол № 16 от 15.04.2021 г.). Эксперименты проводились в соответствии с требованиями Федерации европейских ассоциаций лабораторных животных (FELASA) согласно “Правилам и международным рекомендациям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или других научных целей” (Strasbourg, 1986).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Дядык А.И., Куглер Т.Е., Сулиман Ю.В., Зборовский С.Р., Здиховская И.И. Побочные эффекты статинов: механизмы развития, диагностика, профилактика и лечение // Архив внутренней медицины. 2018. Т. 8. № 4. С. 266–276.
<https://doi.org/10.20514/22266704-2018-8-4-266-276>

Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии: Руководство по клинической лабораторной диагностике: В 2 т. / В.В. Алексеев, А.Н. Алипов, В.А. Андреев и др. Том 2. 3-е изд., доп. и перераб. М.: ООО ГЭОТАР-Медиа, 2013. 792 с.

Кривошапко О.Н., Попов А.М., Артюков А.А., Костецкий Э.Я. Особенности корректирующего действия полярных липидов и биоантиоксидантов из морских гидробионтов при нарушениях липидного и углеводного обмена // Биомедицинская химия. 2012. Т. 58. № 2. С. 189–198.
<http://dx.doi.org/10.18097/PBMC20125802189>

Кушнерова Н.Ф. Коррекция липидного состава плазмы крови и мембран эритроцитов при экспериментальной дислипидемии липидным комплексом из экстракта бурой водоросли *Saccharina japonica* // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2018. Т. 75. № 3. С. 65–73.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.1488050>

Новгородцева Т.П., Сомова Л.М., Гвозденко Т.А., Караман Ю.К., Бивалькевич Н.В. Алиментарная дислипидемия: экспериментально-морфологические аспекты. Владивосток: Дальневосточный федеральный университет, 2011. 168 с.

Подкорытова А.В., Игнатова Т.А., Бурова Н.В., Усов А.И. Перспективные направления рационального использования промысловых красных водорослей рода *Ahnfeltia*, добываемых в прибрежных зонах морей России // Труды ВНИРО. 2019. Т. 176. С. 14–26.

Рыженков В.Е., Макаров В.Г., Ремезова О.В., Макарова М.Н. Методические рекомендации по изучению гиполлипидемического и антисклеротического действия лекарственных средств // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012. С. 445–452.

Фисенко В.П. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Ремедиум, 2000. 398 с.

Фоменко С.Е., Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Другова Е.С., Лесникова Л.Н., Мерзляков В.Ю., Момот Т.В. Сравнительное исследование липидного состава, содержания полифенолов и антирадикальной активности некоторых представителей морских водорослей // Физиология растений. 2019. Т. 66. № 6. С. 452–460.
<https://doi.org/10.1134/S0015330319050051>

Хотимченко С.В., Гусарова И.С. Красные водоросли залива Петра Великого как источник арахидоновой и эйкозапентаеновой кислот // Биология моря. 2004. Т. 30. № 3. С. 215–218.
<https://doi.org/10.1023/B:RUMB.0000033953.67105.6b>

Amenta J.S. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography // J. Lipid. Res. 1964. V. 5. P. 270–272.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)40251-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)40251-2)

- Balk E.M., Lichtenstein A.H., Chung M., Kupelnick B., Chew P., Lau J. Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review // *Atherosclerosis*. 2006. V. 189. № 1. P. 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.02.012>
- Bartosz G., Janaszewska A., Ertel D., Bartosz M. Simple determination of peroxy radical-trapping capacity // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1998. V. 46. № 3. P. 519–528. <https://doi.org/10.1080/15216549800204042>
- Bernstein A.M., Ding E.L., Willett W.C., Rimm E.B. A meta-analysis shows that docosahexaenoic acid from algal oil reduces serum triglycerides and increases HDL-cholesterol and LDL-cholesterol in persons without coronary heart disease // *J. Nutr.* 2012. V. 142. № 1. P. 99–104. <https://doi.org/10.3945/jn.111.148973>
- Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959. V. 37. № 8. P. 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Bodur A., İnce İ., Kahraman C., Abidin İ., Aydin-Abidin S., Alver A. Effect of a high sucrose and high fat diet in BDNF (+/-) mice on oxidative stress markers in adipose tissues // *Arch. Biochem. Biophys.* 2019. V. 665. P. 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.02.004>
- Bradford M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. № 1–2. P. 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation // *Methods Enzymol.* 1978. V. 52. P. 302–310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- Burillo E., Martín-Fuentes P., Mateo-Gallego R., Baila-Rueda L., Cenarro A., Ros E., Civeira F. Omega-3 Fatty Acids and HDL. How Do They Work in the Prevention of Cardiovascular Disease? // *Curr. Mol. Pharmacol.* 2012. V. 10. P. 432–441. <http://dx.doi.org/10.2174/157016112800812845>
- Burk R.F., Lawrence R.A., Lane J.M. Liver Necrosis and Lipid Peroxidation in the Rat as the Result of Paraquat and Diquat Administration: Effect of selenium deficiency // *J. Clin. Investig.* 1980. V. 65. № 5. P. 1024–1031. <https://doi.org/10.1172/JCI109754>
- Chen J., Jiang Y., Ma K.Y., Chen F., Chen Z.Y. Microalga decreases plasma cholesterol by down-regulation of intestinal NPC1L1, hepatic LDL receptor, and HMG-CoA reductase // *J. Agric. Food. Chem.* 2011. V. 59. № 12. P. 6790–6797. <https://doi.org/10.1021/jf200757h>
- Connor W.E., Connor S.L. Dietary treatment of familial hypercholesterolemia // *Arteriosclerosis*. 1989. V. 9. № 1 Suppl. P. I91–I05.
- Folch J., Less M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // *J. Biol. Chem.* 1957. V. 226. № 1. P. 497–509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
- Francisqueti F., Chiaverini L., Carolo Dos Santos K., Minatel I.O., Ronchi C., Ferron A., Ferreira A., Correa C. The role of oxidative stress on the pathophysiology of metabolic syndrome // *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2017. V. 63. P. 85–91. <https://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.63.01.85>
- Garrel C., Alessandri J.-M., Guesnet P., Al-Gubory K.H. Omega-3 fatty acids enhance mitochondrial superoxide dismutase activity in rat organs during post-natal development // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2012. V. 44. № 1. P. 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.007>
- Ghezalbash B., Shahrokhi N., Khaksari M., Ghaderi-Pakdel F., Asadikaram G. Hepatoprotective effects of Shilajit on high fat-diet induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats // *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 2020. V. 41. № 1. P. 20190040. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2019-0040>
- Goldberg D.M., Spooner R.J. Assay of Glutathione Reductase // *Method. Enzymat. Anal.* — Deerfield Beach: Verlag Chemie, 1983. V. 3. P. 258–265.
- Hirotsu Y., Ozaki N., Tsuji Y., Urashima Y., Myotoku M. Effects of eicosapentaenoic acid on hepatic dyslipidemia and oxidative stress in high fat diet-induced steatosis // *Int. J. Food. Sci. Nutr.* 2015. V. 66. № 5. P. 569–573. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1042848>
- Jimoh A., Tanko Y., Ahmed A., Mohammed A., Ayo J.O. Resveratrol prevents high-fat diet-induced obesity and oxidative stress in rabbits // *Pathophysiology*. 2018. V. 25. № 4. P. 359–364. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2018.07.003>
- Johnson M., Bradford C. Omega-3, Omega-6 and Omega-9 Fatty Acids: Implications for Cardiovascular and Other Diseases // *J. Glycomics Lipidomics*. 2014. V. 4. P. 2153–0637. 1000123. <http://dx.doi.org/10.4172/2153-0637.1000123>
- Komprda T., Škultéty O., Křížková S., Zorníková G., Rožíková V., Krobot R. Effect of dietary Schizochytrium microalga oil and fish oil on plasma cholesterol level in rats // *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*. 2015. V. 99. № 2. P. 308–316. <https://doi.org/10.1111/jpn.12221>
- Liu L., Hu Q., Wu H., Xue Y., Cai L., Fang M., Liu Z., Yao P., Wu Y., Gong Z. Protective role of n6/n3 PUFA supplementation with varying DHA/EPA ratios against atherosclerosis in mice // *J. Nutr. Biochem.* 2016. V. 32. P. 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.02.010>
- Mišurcová L., Ambrožová J., Samek D. Seaweed lipids as nutraceuticals // *Adv. Food. Nutr. Res.* 2011. V. 64. P. 339–355. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387669-0.00027-2>
- Murthy S., Albright E., Mathur S.N., Field F.J. Modification of CaCo-2 cell membrane fatty acid composition by eicosapentaenoic acid and palmitic acid: effect on

- cholesterol metabolism // *J. Lipid. Res.* 1988. V. 29. № 6. P. 773–780.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)38490-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)38490-X)
- Noeman S.A., Hamooda H.E., Baalash A.A. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats // *Diabetol. Metab. Syndr.* 2011. V. 3. № 1. P. 17–24.
<https://doi.org/10.1186/1758-5996-3-17>
- Öngün Yılmaz H. Hyperlipidemia and Nutrition // *Türkiye Sağlık Bilimleri ve Araştırmaları Dergisi.* 2018. V. 2. № 1. P. 72–82.
- Paoletti F., Aldinucci D., Mocali A., Caparrini A. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts // *Anal. Biochem.* 1986. V. 154. № 2. P. 536–541.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90026-6)
- Patten A.R., Brocardo P.S., Christie B.R. Omega-3 supplementation can restore glutathione levels and prevent oxidative damage caused by prenatal ethanol exposure // *J. Nutr. Biochem.* 2013. V. 24. № 5. P. 760–769.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.04.003>
- Ramji D.P. Polyunsaturated Fatty Acids and Atherosclerosis: Insights from Pre-Clinical Studies // *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.* 2019. V. 121. № 1. P. 1800029.
<https://doi.org/10.1002/ejlt.201800029>
- Refaat B., Abdelghany A.H., Ahmad J., Abdalla O.M., Elshopakey G.E., Idris S., El-Boshy M. Vitamin D(3) enhances the effects of omega-3 oils against metabolic dysfunction-associated fatty liver disease in rat // *Biofactors.* 2022. V. 48. № 2. P. 498–513.
<https://doi.org/10.1002/biof.1804>
- Richard D., Kefi K., Barbe U., Bausero P., Visioli F. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants // *Pharmacol. Res.* 2008. V. 57. № 6. P. 451–455.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.05.002>
- Shibabaw T. Omega-3 polyunsaturated fatty acids: anti-inflammatory and anti-hypertriglyceridemia mechanisms in cardiovascular disease // *Mol. Cell. Biochem.* 2021. V. 476. № 2. P. 993–1003.
<https://doi.org/10.1007/s11010-020-03965-7>
- Sirichaiwetchakoon K., Lowe G.M., Kupittayanant S., Churproong S., Eumkeb G. Pluchea indica (L.) Less. Tea Ameliorates Hyperglycemia, Dyslipidemia, and Obesity in High Fat Diet-Fed Mice // *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2020. V. 2020. P. 8746137.
<https://doi.org/10.1155/2020/8746137>
- Susanto E., Fahmi A.S., Hosokawa M., Miyashita K. Variation in Lipid Components from 15 Species of Tropical and Temperate Seaweeds // *Mar. Drugs.* 2019. V. 17. № 11. P. 630–651.
<https://doi.org/10.3390/md17110630>
- Svetashev V.I., Vaskovsky V.E. A simplified technique for thin-layer microchromatography of lipids // *J. Chromatogr.* 1972. V. 67. № 2. P. 376–378.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)91245-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)91245-2)
- Torres N., Guevara-Cruz M., Velázquez-Villegas L.A., Tovar A.R. Nutrition and Atherosclerosis // *Arch Med Res.* 2015. V. 46. № 5. P. 408–426.
<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2015.05.010>
- Yanagita T., Nagao K. Functional lipids and the prevention of the metabolic syndrome // *Asia. Pac. J. Clin. Nutr.* 2008. V. 17 Suppl 1. № 1. P. 189–191.

LIPID-CORRECTING AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF THE LIPID COMPLEX FROM THE RED MARINE ALGAE *AHNFELTIA TOBUCHIENSIS* UNDER THE CONDITIONS OF A HIGH-FAT DIET

V. G. Sprygin^{1, #}, N. F. Kushnerova¹, S. E. Fomenko¹,
 E. S. Drugova¹, L. N. Lesnikova¹, V. Yu. Merzlyakov¹

1V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute. FEB RAS, Vladivostok, 690041 Russia

#e-mail: vgs2006@mail.ru

The influence of the lipid complex isolated from the thallus of the red marine algae *Ahnfeltia tobuchiensis* (LCA) on the metabolic parameters of the blood and liver of rats under a high-fat diet was studied. It was shown that the administration of LCA had a pronounced lipid-correcting and antioxidant effect, which was superior to that of the reference preparation “Omega 3-6-9” in terms of its ability to restore lipid metabolism, the ratio of lipoprotein fractions and the indices of the endogenous antioxidant protection system, as so as prevent the development of hepatosis. The lipid-correcting and anti-oxidant effect of LCA is specified by the action of n-3 polyunsaturated fatty acids, in particular eicosapentaenoic acid, which are the part of the structure of phospholipids and glycolipids of marine origin, which make up the main part of the studied lipid complex.

Keywords: *Ahnfeltia tobuchiensis*, marine lipids, n-3 PUFA, lipid metabolism, antioxidant system, dislipidemia, high-fat diet

ЛИПИДНЫЙ ПРОФИЛЬ ПЕСТРЯТОК И СМОЛТОВ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ *SALMO SALAR* L., ВЫРАЩЕННЫХ В АКВАКУЛЬТУРЕ, ПРИ ВВЕДЕНИИ РАЗНЫХ РЕЖИМОВ ОСВЕЩЕНИЯ

© 2024 г. Д. С. Провоторов*, @, С. А. Мурзина*, В. П. Воронин*, Д. И. Манойлова*,
М. В. Кузнецова*, А. Е. Курицын*, Н. Н. Немова*

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

@E-mail: klaydim1@mail.ru

Поступила в редакцию 26.05.2023 г.

После доработки 31.08.2023 г.

Принята к публикации 31.08.2023 г.

Изучение биохимических механизмов влияния дополнительного освещения на процессы роста и раннего развития лососевых рыб в аквакультуре позволяют выявлять закономерности замедленного или ускоренного роста, а также наступления периода смолтификации. В настоящей работе получены результаты изменения липидного статуса у пестряток и смолтов атлантического лосося после “зимнего окна” (декабрь — январь), полученных от трех экспериментальных групп, подвергшихся на этапе сеголетков действию различных режимов освещения и кормления. Результаты изменения липидного состава исследованной молодежи лосося свидетельствуют о наступлении смолтификации, причем во всех экспериментальных группах, однако этот эффект наиболее выражен для молодежи, ранее содержащейся при круглосуточном освещении в летне-осенний сезон.

Ключевые слова: липиды, смолтификация, онтогенез, аквакультура, атлантический лосось

DOI: 10.31857/S1026347024010042, **EDN:** LULQUC

ВВЕДЕНИЕ

Атлантический лосось (*Salmo salar* L.) — один из самых коммерчески востребованных премиальных видов аквакультуры. Биология и экология атлантического лосося хорошо изучены, что позволяет достаточно эффективно его выращивать на предприятиях аквакультуры и достигать заданных показателей. При этом биология данного вида рыб имеет особенности, усложняющие процесс выращивания. Так, известно, что жизненный цикл атлантического лосося включает два этапа: “речной” и “морской”. Молодь лосося проводит в реке от двух до пяти лет, и за это время ее размерно-массовые характеристики изменяются незначительно, однако на уровне физиолого-биохимических и тканевых процессов происходят существенные преобразования, которые способствуют подготовке организма к смолтификации (Немова и др., 2019). При достижении определенных эндогенных и экзогенных условий молодь лосося претерпевает комплексную трансформацию пестряток

в смолтов, связанную с подготовкой к обитанию в морской среде, где скорость их роста по сравнению с речным периодом возрастает многократно. К числу экологических факторов, влияющих на смолтификацию, относят температуру среды, трофику и фотопериод (в частности, увеличение длины светового дня весной) (Duston, Saunders, 1992; Thrush *et al.*, 1994; Duncan *et al.*, 1998). Известно, что изменения продолжительности светового дня служат сезонными сигналами, которые воспринимаются молодью лосося и синхронизируются с его эндогенными ритмами, контролирующими развитие (Duston, Saunders, 1990). Для предприятий аквакультуры существенный интерес представляет сокращение “речного” периода жизненного цикла атлантического лосося и ускорение наступления смолтификации. Это позволяет переносить рыб в морскую/соленую воду в более ранние сроки, что в конечном итоге приводит к повышению производительности предприятия и снижению финансовых затрат на выращивание молодежи. Поэтому для повышения эффективности искусственного

выращивания молоди лососевых используют различные режимы регулирования естественного фотопериода (Björnsson *et al.*, 1989, 2011; Mason *et al.*, 1992; Handeland, Stefansson, 2001). При этом для завершения смолтификации необходимо использование так называемых зимних (коротких) режимов фотопериода — последовательное чередование режимов фотопериода “лето — зима — лето” с уменьшением продолжительности зимнего периода освещения (“зимнее окно”) (Duston, Saunders, 1990; Thrush *et al.*, 1999, Шульгина и др., 2021). Эти процессы сопровождаются изменениями в биохимическом метаболизме, которые характеризуют адаптивные возможности организма. Среди биохимических показателей, отражающих реакцию организма на изменение внешних условий, в том числе фотопериода, значительная роль отводится липидам, которые могут играть роль индикаторов физиологических изменений (Немова и др., 2019, 2020; Nemova *et al.*, 2020), в том числе при смолтификации. Известно сравнительно небольшое число работ, в которых изучается влияние фотопериода на липидный состав и метаболизм молоди атлантического лосося в условиях аквакультуры (Wedemeyer *et al.*, 1980; Sheridan, 1989; Duston, Saunders, 1995).

Для того чтобы установить роль липидов в адаптации молоди атлантического лосося к факторам среды при искусственном выращивании ранее был поставлен эксперимент по введению постоянного искусственного освещения (24LD) в стандартную технологию выращивания молоди в условиях, характерных для южного региона (Республика Северная Осетия — Алания). На первом этапе работы были отобраны сеголетки и было показано (Мурзина и др., 2023а, 2023б), что стимулирующий подготовку к смолтификации сеголеток атлантического лосося эффект совокупного действия фотопериода и кормления достигается при их сочетании в круглосуточном режиме в летне-осенний период. При этом наиболее четкие тренды к трансформации липидного метаболизма с “пресноводного” типа на “морской” наблюдались у варианта, выращиваемого в условиях круглосуточного освещения и кормления.

В данной работе представлены результаты второго этапа эксперимента и обсуждаются изменения липидного статуса у пестряток и смолтов атлантического лосося после “зимнего окна” (декабрь — январь) и при дальнейшем выращивании в условиях естественного освещения в товарной аквакультуре в условиях Северной Осетии — Алании.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование влияния фотопериода на рост и развитие молоди атлантического лосося проводили на предприятии ООО “Остров аквакультура” (Республика Северная Осетия — Алания). Условия

эксперимента и его особенности описаны в нашей первой публикации, включающей результаты исследования липидного профиля у сеголеток лосося (Мурзина и др., 2023а) при введении дополнительного освещения. А именно: для стимуляции эндогенных механизмов, влияющих на ростовые процессы, во все бассейны с сеголетками (после перехода на экзогенное питание) было установлено непрерывное освещение (24LD) с использованием светодиодных осветителей LED (36 W, 6500 K). Кормление проводилось в круглосуточном режиме каждые два часа с использованием коммерческого корма. В августе сеголеток средней массой 2.3 г пересадили в выростные лотки размером 4 × 1.2 м, объемом 2.5–2.7 м³, в количестве 4900 особей/лоток. С начала сентября сеголеток разделили на три группы по 2 лотка и стали содержать в следующих (экспериментальных) условиях: группа 24LD + КК — режим освещения постоянный (24LD), кормление круглосуточное (КК); группа ЕстLD + КД — естественное освещение (ЕстLD), кормление проводится в светлое время суток (с 06:00 до 18:00 в сентябре, с 08:00 до 18:00 в октябре, с 08:00 до 17:00 в ноябре) через каждые два часа (КД); группа 24LD + КД — режим освещения постоянный (24LD), кормление проводится только в светлое время суток, как у рыб из опыта № 1 (КД).

С начала декабря подросшую молодь, согласно экспериментальным группам, перенесли в круглые бассейны объемом 2,1 м³ (диаметром 2 м, высотой 1 м) в количестве в среднем 2800 на бассейн. С декабря по январь дополнительное освещение не применялось — упомянутое выше “зимнее окно”. Далее выращивание пестряток и смолтов проходило в условиях естественного освещения региона. Условия дневного освещения: 5500 lx, в пасмурную погоду — 500 lx (рис. 1).

В эксперименте использовали коммерческий корм марки Scretting Nutra HP (Италия) фракция 1,8 (с ноября по февраль) и BioMar Эфико Альфа 790 (Дания) фракция 3 (с февраля по март), оба корма схожи по составу и пищевой ценности; расчет корма проводили согласно нормам возрастной группы и с учетом биомассы. Вода в лотки поступала в объеме 2.7–3 л/с на лоток со скважины, поэтому температурный режим был постоянным и с середины декабря по конец марта составил 10.3–10.8°C. Содержание кислорода в лотках 10.3–10.5 мг утром с постепенным снижением до 8.5–8.2 мг вечером (замеры проводились утром в 07:00 и вечером в 19:00). Отход за период с декабря по март составил 26, 42 и 34% особей в группах 24LD + КК, ЕстLD + КД и 24LD + КД соответственно.

Общая средняя масса рыб (пестрятки вместе со смолтами) на 2 марта составила 59.44 ± 3.45, 57.71 ± 5.22, 53.88 ± 4.52 в группе 24LD + КК,

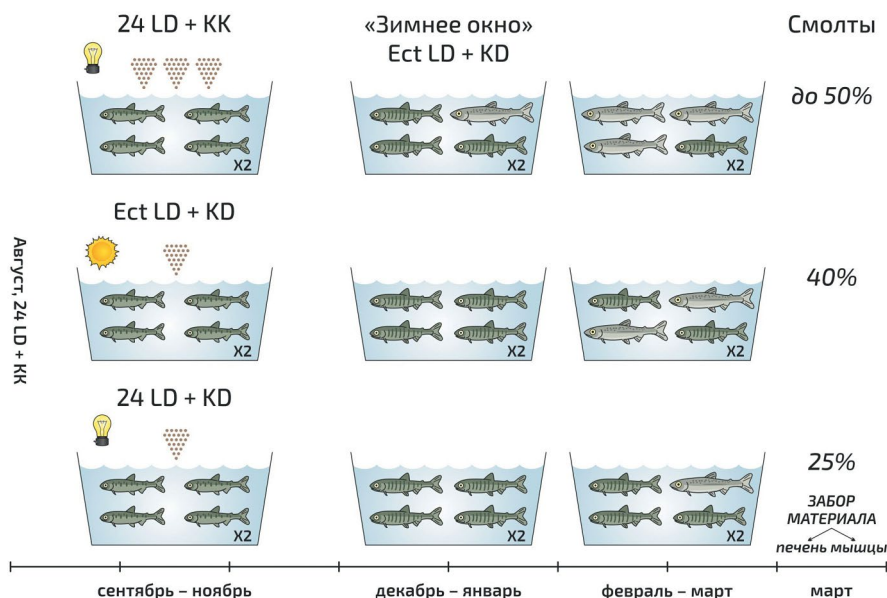


Рис. 1. Общая схема эксперимента.

группе ЕctLD + КД и группе 24LD + КД соответственно. Количество смолтов в исследуемых группах на день анализа (3 марта) составило: в группе 24LD + КК – до 50%, ЕctLD + КД – 40%, 24LD + КД – 25%. Для исследования отбирали пестряток и смолтов лосося в начале марта (отбор особей проводили из каждой группы, которые на этапе развития сеголеток подвергались дополнительному освещению).

На предприятии проводилась фоторегистрация рыб в бассейнах в период эксперимента (рис. 2).

Проводили липидный анализ образцов мышц и печени молоди рыб. Экстракцию липидов из отобранных образцов мышц и печени молоди лосося проводили по методу Фолча (Folch et al., 1957) и Кейтс (1975). Затем липиды концентрировали с помощью роторно-вакуумной установки Hei-VAP Adavantage HL/G3 (Heidolph, Германия). Выделенные суммарные липиды и обезжиренный остаток (включающий белки, углеводы, нуклеиновые кислоты, аминокислоты и микроэлементы) сушили до постоянной массы. Содержание общих липидов в образцах представлено в виде % сухого вещества.

Качественное и количественное определение отдельных липидных классов осуществляли при помощи метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). Фракционирование общих липидов проводили на пластинках на стеклянной основе – НРТLC Silicagel 60 F254 Premium Purity (Merck, Германия). Нанесение экстракта липидов осуществлялось при помощи полуавтоматического аппликатора Linomat 5 (CAMAG, Швейцария) микрошприцем на 100 мкл

штриховым методом. В качестве элюента, а также раствора для насыщения хроматографической камеры ADC2 (CAMAG, Швейцария) использовалась система растворителей гексан – диэтиловый эфир – уксусная кислота (32:8:0.8 по объёму) (Olsen, Henderson, 1989). Насыщение хроматографической камеры проводили в течение 20 минут с одновременным контролем влажности (10 минут), после чего проводилось насыщение пластины (20 минут). Дистанция подвижной фазы составляла 80 мм (R_f конечная = 80 мм), сушка пластины осуществлялась в течение 5 минут. Проявление липидных пятен проводили в растворе медного купороса (CuSO_4) с ортофосфорной кислотой (H_3PO_4) и нагреванием пластины до 160°C в течение 15 минут (Hellwig, 2005). Качественное и количественное определение липидных компонентов было выполнено в камере денситометра TLC Scanner 4 (CAMAG, Швейцария) на дейтериевой лампе при длине волны 350 нм в режиме адсорбции (Hellwig, 2005). Идентификация липидных классов проводилась по референтным стандартам соответствующих компонентов (Sigma-Aldrich, США) с учетом соответствия значений R_f . В составе общих липидов анализировали: общие фосфолипиды (ФЛ), триацилглицерины (ТАГ), диацилглицерины (ДАГ), моноацилглицерины (МАГ), холестерин (ХС), эфиры холестерина (ЭХС), свободные жирные кислоты (СЖК), воска.

Качественное и количественное определение индивидуальных фосфолипидных фракций – фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭА), фосфатидилсерина (ФС), фосфатидилинозитола (ФИ), лизофосфатидилхолина (ЛФХ),

сфингомиелина (СФМ) — осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием жидкостного хроматографа “Стайер” (ООО “Аквилон”, Россия). Фракционирование общих ФЛ проводили на колонке размером 250×4 мм, наполненной сорбентом “Нуклеосил 100-7” (“Элсико”, Россия) и с использованием в качестве подвижной фазы смеси ацетонитрил — метанол — гексан — 85%-я фосфорная кислота (918: 30: 30: 17.5 по объёму) при скорости потока 1 мл/мин. Детектирование анализируемых липидных классов осуществляли на спектрофотометре по поглощению в ультрафиолетовом свете при длине волны 206 нм. Качественная идентификация липидных классов осуществлялась по стандартам соответствующих компонентов (Sigma-Aldrich, США) с учетом соответствия значений R_f .

Исследования выполнены на базе лаборатории экологической биохимии и с использованием оборудования Центра коллективного пользования ФИЦ “Карельский научный центр Российской академии наук”.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием языка программирования R (v. 3.6.1.) в среде разработки RStudio с применением дополнительных пакетов: readxl (v. 1.3.1), tidyverse (v. 1.3.0), ggplot2 (v. 3.4.0). Для описания количественного содержания индивидуальных липидных классов и суммарных семейств жирных кислот были рассчитаны параметры описательной статистики (среднее арифметическое и ошибка среднего арифметического) с группировкой по месяцам и типу экспериментального освещения. Полученные результаты были визуализированы в виде гистограмм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Липидный профиль мышц пестряток и смолтов атлантического лосося

Содержание ОЛ в мышцах у пестряток и смолтов в марте было в пределах от 7.84 до 12.24% сухого вещества. Установлено, что у смолтов из группы ЕстLD + КД отмечено достоверно меньшее содержание ОЛ по сравнению с образцами из групп 24LD + КК и 24LD + КД (6.84% против 10.48 и 12.24% соответственно). Наблюдается достоверное снижение ОЛ у смолтов по сравнению с пестрятками в группах 24LD + КК и ЕстLD + КД. При этом у смолтов в группе 24LD + КД, напротив, выявлено достоверное увеличение показателя.

В липидном профиле мышц пестряток и смолтов всех обозначенных выше экспериментальных групп, доминировали энергетические липиды в форме ТАГ (1.98–3.82% сухого вещества). Далее по количественному содержанию следовали структурные липиды — ФЛ (0.88–2.31%) и ХС

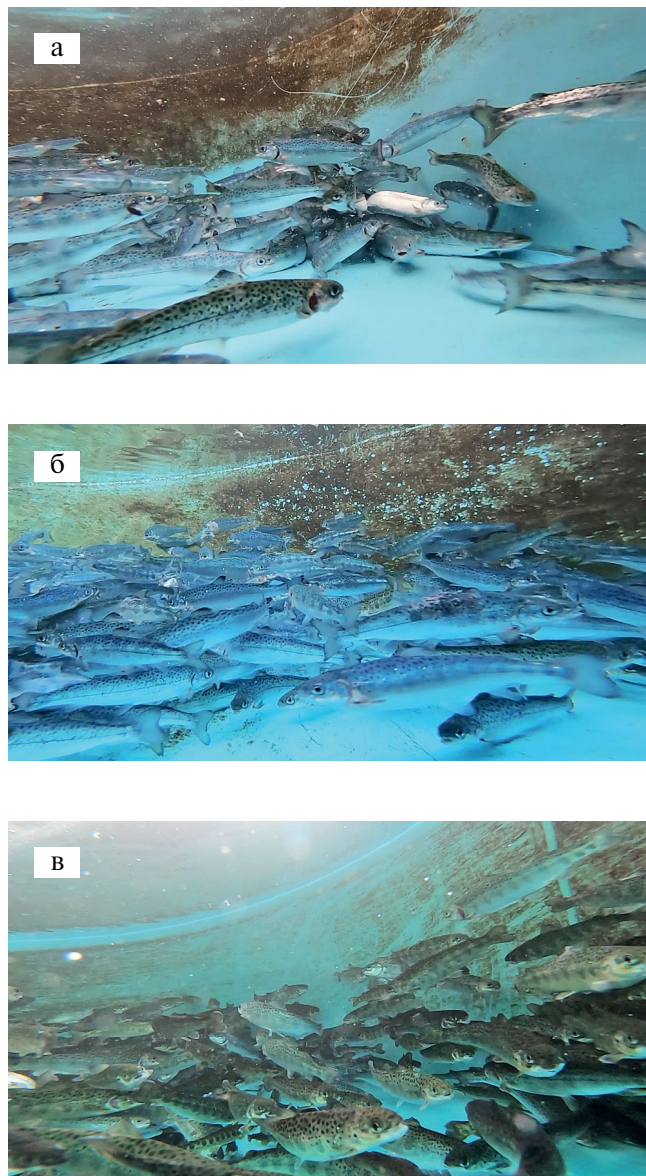


Рис. 2. Фотографии молоди лосося в эксперименте: а — группа 24LD + КК; б — группа ЕстLD + КД; в — группа 24LD + КД.

(0.81–1.59%). Содержание такого “универсального” класса липидов как СЖК было в пределах от 1.07 до 2.0%, а ЭХС — от 1.2 до 2.16% и восков — от 0.23 до 0.52%. Минорные липиды “сигнальные” ДАГ варьировали в пределах от 0.43 до 0.88%, МАГ — от 0.16 до 0.34% (рис. 3).

В мышцах пестряток не обнаружено достоверных отличий по содержанию исследованных липидных классов между группой 24LD + КК и ЕстLD + КД, при этом рыбы группы 24LD + КД отличались достоверно меньшим содержанием ДАГ, СЖК и восков по сравнению с таковыми из группы 24LD + 24КК. При этом в мышцах смолтов

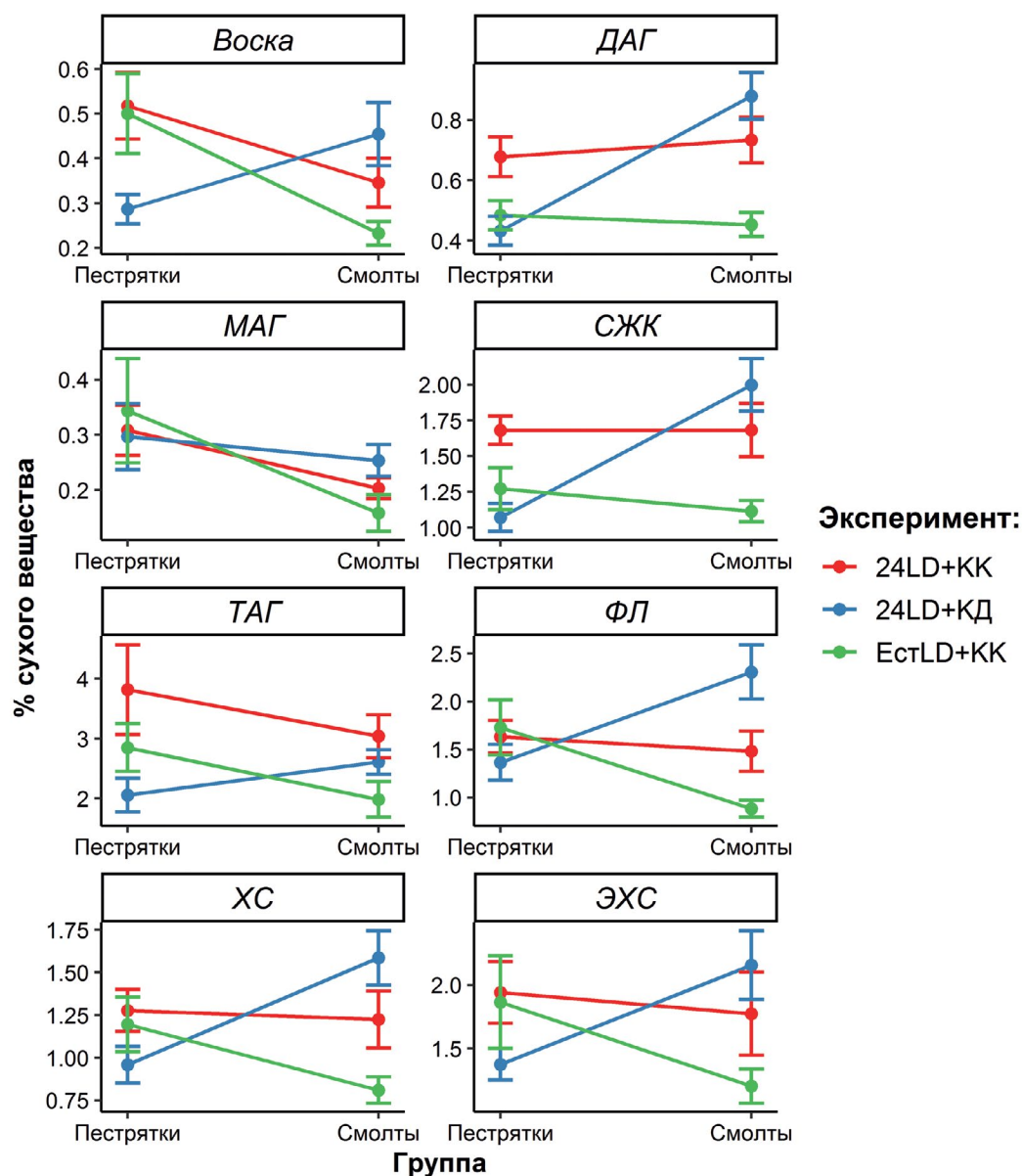


Рис. 3. Динамика липидных классов (% сухого вещества) в мышцах молоди атлантического лосося в трех исследованных экспериментальных вариантах в марте.

На рисунке использованы следующие аббревиатуры для исследованных липидных классов: ФЛ – общие фосфолипиды, ТАГ – триацилглицерины, ДАГ – диацилглицерины, МАГ – моноацилглицерины, ХС – холестерин, ЭХС – эфиры холестерина, СЖК – свободные жирные кислоты.

наблюдается достоверно меньшее содержание ФЛ, ДАГ, ХС, СЖК и ТАГ в группе ЕстLD + КД по сравнению с группой 24LD + КК, при этом образцы из группы 24LD + КД достоверно отличаются от 24LD + КК только в содержании ФЛ.

У смолтов по сравнению с пестрятками в группах 24LD + КК и ЕстLD + КД в мышцах наблюдается уменьшение количества как энергетических ТАГ (недостоверное у обеих групп), так и структурных ФЛ (достоверно для группы ЕстLD + КД), в то

время как у смолтов 24LD + КД, напротив, наблюдается увеличение содержания данных липидных классов (достоверное у ФЛ). При этом отношение ТАГ/ФЛ недостоверно снижается у рыб групп 24LD + КК и 24LD + КД, в то время как в группе ЕстLD + КД можно наблюдать обратную картину. Также необходимо отметить достоверное снижение МАГ и восков у рыб группы ЕстLD + КД и достоверное увеличение ДАГ, ХС, СЖК и ЭХС в группе 24LD + КД.

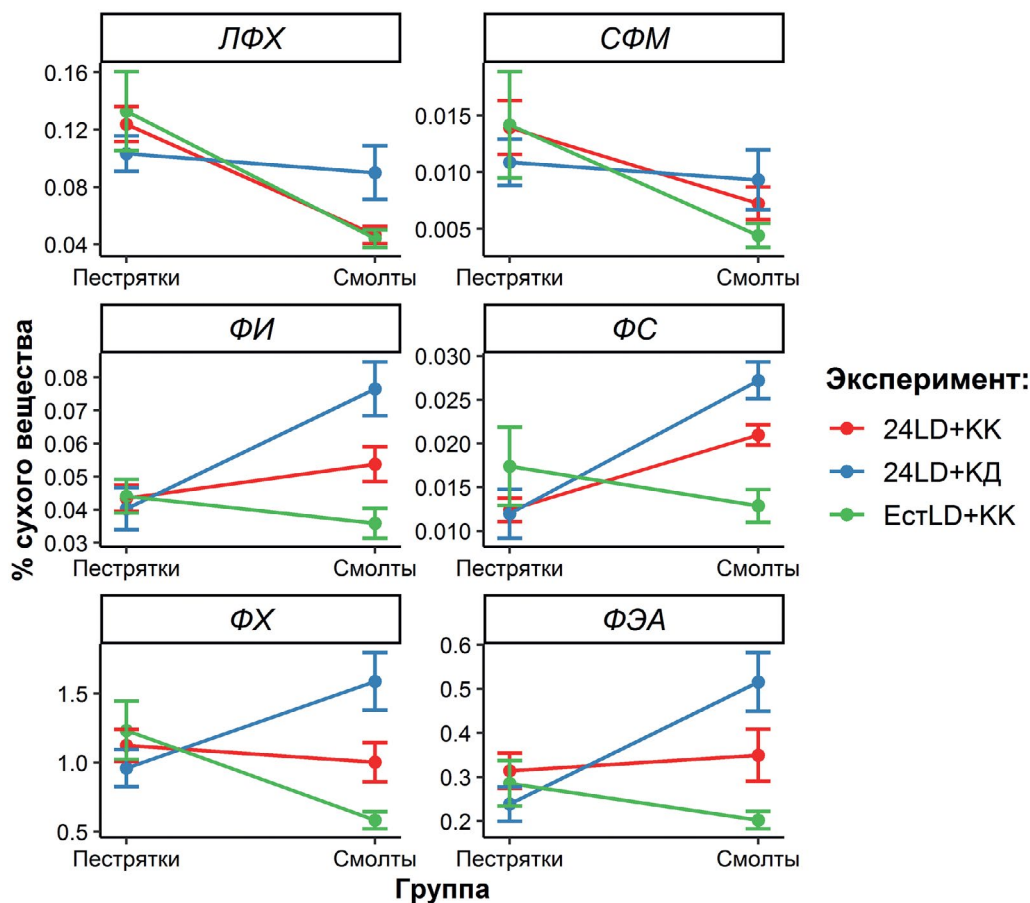


Рис. 4. Динамика некоторых фосфолипидных классов (% сухого вещества) в мышцах молоди атлантического лосося в трех исследованных экспериментальных вариантах в марте.

На рисунке использованы следующие аббревиатуры для исследованных фосфолипидных классов: ФИ – фосфатидилинозитол, ФС – фосфатидилсерин, ФЭА – фосфатидилэтаноламин, ФХ – фосфатидилхолин, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, СФМ – сфингомиелин.

В фосфолипидном профиле мышц пестряток и смолтов преобладал ФХ (0.96–1.59%), за ним следовал ФЭА (0.20–0.52%). У пестряток достоверных отличий в содержании фосфолипидов между экспериментальными группами не обнаружено. У смолтов в группе ЕстLD + КД по сравнению с 24LD + КК наблюдается достоверно меньшее содержание ФИ, ФС и ФХ и достоверно большее содержание этих же компонентов у рыб 24LD + КД по сравнению с 24LD + КК и ЕстLD + КД. У смолтов по сравнению с пестрятками можно наблюдать значимое снижение ФХ в группе ЕстLD + КД. В группе 24LD + КД у смолтов достоверно возрастает количество ФИ, ФС, ФЭА и ФХ (рис. 4).

Липидный профиль печени пестряток и смолтов атлантического лосося

Несколько иной результат (по сравнению с мышцами) по содержанию ОЛ выявлен в печени:

у рыб групп 24LD + КК и ЕстLD + КД установлено недостоверное увеличение данного показателя (с 28.44 до 32.57 и с 24.19 до 27.19% сухого вещества соответственно), в то время как в группе 24LD + КД наблюдается достоверное увеличение количества ОЛ у смолтов по сравнению с пестрятками (с 34.56 до 17.08% сухого вещества).

Липидный профиль печени пестряток и смолтов представлен ТАГ, содержание которых колебалось в пределах от 4.41 до 6.68%, ФЛ – от 2.72 до 6.34%, ХС – от 2.6 до 5.98%, СЖК – от 2.45 до 4.28%, ЭХС – от 2.72 до 8.3%, восков – от 0.8 до 1.54%, ДАГ – от 1.03 до 1.79%, МАГ – от 0.33 до 1.06% (рис. 5).

Не обнаружено достоверных отличий в содержании липидных классов в печени пестряток между группами 24LD + КК и ЕстLD + КД. Показано, что у рыб в группе 24LD + КД по сравнению с ЕстLD + КК достоверно выше содержание МАГ, восков и ЭХС. В печени смолтов выявлено

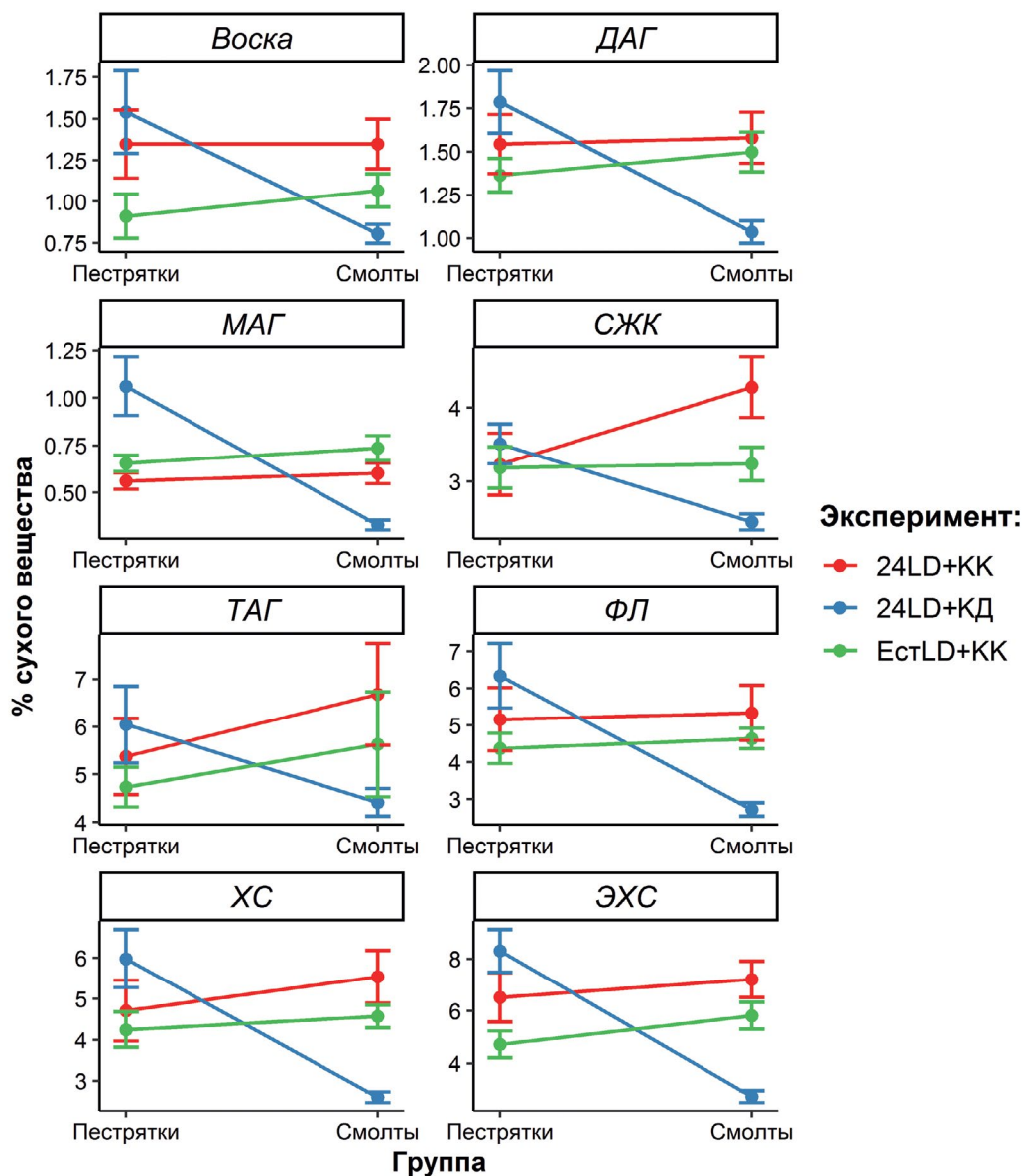


Рис. 5. Динамика липидных классов (% сухого вещества) в печени молоди атлантического лосося в трех исследованных экспериментальных вариантах в марте.

достоверно меньшее содержание исследованных липидных классов в группе 24LD + КД по сравнению с 24LD + КК и ЕстLD + КД, за исключением ТАГ.

У рыб в группах 24LD + КК и ЕстLD + КД не выявлено статистически значимой динамики в изменении основных липидных классов в печени смолтов по сравнению с пестрятками. При этом у рыб группы 24LD + КД наблюдается снижение всех липидных классов (для ТАГ и восков — не достоверное). Во всех группах наблюдается увеличение отношения ТАГ/ФЛ (достоверное только для рыб 24LD + КД).

Среди фосфолипидов печени пестряток и смолтов, как и в мышцах, показано доминирование ФХ (1.69–4.14%) и ФЭА (0.76–1.52%). Не выявлено выраженной динамики основных фосфолипидных классов у рыб 24LD + КК и ЕстLD + КД. При этом в группе 24LD + КД у смолтов показано их снижение (достоверное для всех компонентов, кроме ЛФХ) (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования свидетельствуют о том, что в марте, после так называемого зимнего окна,

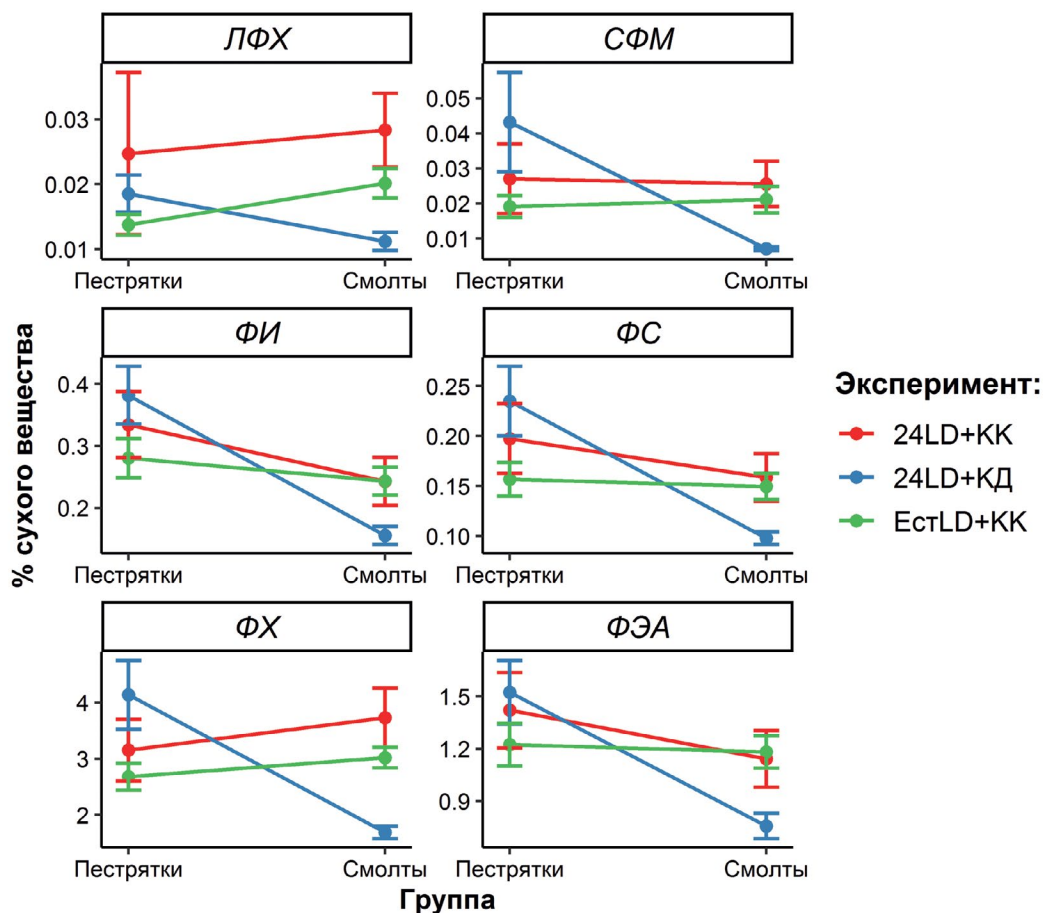


Рис. 6. Динамика некоторых фосфолипидных классов (% сухого вещества) в печени молоди атлантического лосося в трех исследованных экспериментальных вариантах в марте.

у молоди атлантического лосося трех экспериментальных групп, подвергшихся на этапе сеголетков действию различных режимов освещения и кормления, обнаружено некоторое снижение количества общих липидов в мышцах смолтов по сравнению с пестрятками, за исключением рыб группы 24LD + КД, в которой в процессе трансформации “пестряток – смолт” этот показатель остался практически неизменным. Наблюдается продолжение тенденции, выявленной в первой части (сентябрь – ноябрь) исследования (Мурзина и др., 2023а), когда было отмечено снижение в ноябре содержания общих липидов во всех изученных вариантах эксперимента у сеголетков к ноябрю, что является одним из индикаторов смолтификации (Мурзина и др., 2023а, 2023б).

Известно, что в процессе “переключения” метаболизма в связи с подготовкой к новым условиям обитания у лососевых рыб снижение запасов липидов происходит преимущественно за счет ТАГ (Sheridan, 1989), при этом активизируются процессы липолиза и, напротив, снижение липогенеза.

В данном исследовании показано некоторое (недостовверное) снижение ТАГ в мышцах при смолтификации у рыб во всех исследованных вариантах, кроме группы 24LD + КД. В целом для рыб из групп 24LD + КК и ЕстLD + КД отмечена общность состояния: недостаточное снижение исследованных липидных классов (за исключением ДАГ, содержание которых незначительно и недостаточное увеличивается в группе 24LD + КК).

Соотношение энергетических липидов к структурным, ТАГ/ФЛ – показатель, отражающий направленность и активность процессов энергетического и пластического обменов. Снижение данного показателя может указывать на усиление энергетического обмена и на участие именно запасных липидов в поддержании энергетических потребностей организма в этот период, в том числе на прирост массы. В мышцах молоди лосося в группе 24LD + КК наблюдается незначительное и недостаточное снижение данного показателя, что может указывать на продолжение и завершение тенденции, более четко выраженной ранее у сеголетков.

Вероятно, период энергоемких метаболических изменений завершен и наблюдается переход к накоплению энергетических запасов в мышцах. Дополняет данное предположение и недостоверное увеличение этого показателя у смолтов в ЕстLD + КД, у которых, судя по всему, на уровне липидного обмена перестройка организма при смолтификации происходит единым “паттерном” с рыбами группы 24LD + КК. В мышцах рыб группы 24LD + КД также наблюдается недостоверное снижение данного показателя.

В фосфолипидном профиле мышц молоди лосося показано достоверное увеличение ФС у смолтов 24LD + КК и 24LD + КД по сравнению с пестрятками. Известно, что ФС имеет особое значение для рыб, у которых происходят значительные колебания солености окружающей среды на отдельных этапах жизненного цикла, поскольку известно, что ФС участвует в регуляции активности “ферментов осморегуляции”, чем обеспечивается поддержание гомеостаза организма к жизни в новых условиях среды (Геннис, 1997). Недостоверное снижение ФС у молоди ЕстLD + КК может указывать на схожую направленность перестройки метаболизма, но скорость таковых процессов ниже по сравнению со смолтами группы 24LD + КК. Отмечена схожесть состава и динамики изменений отдельных ФЛ у смолтов групп 24LD + КК и ЕстLD + КД.

Недостоверные изменения остальных исследованных ФЛ в мышцах рыб групп 24LD + КК и ЕстLD + КД, включая доминирующие ФЭА и ФХ на фоне плавного снижения минорного ЛФХ, могут указывать, с одной стороны, на то, что в процессе смолтификации ФЛ, особенно мажорные по количеству, изменяются слабо, выполняя основную структурную функцию в организме. Реорганизация ФЛ-состава достигается за счет минорных ФЛ, в большей степени тех, что принимают участие в осморегуляции, тем самым изменения фосфолипидного профиля в данных группах происходят на подготовительном этапе смолтификации (Мурзина и др., 2023b), а в марте наблюдается “следовой эффект” перестройки на уровне ФЛ.

В печени рыб из групп 24LD + КК и ЕстLD + КД установлено недостоверное изменение всех исследованных показателей, что может указывать на функционирование данного органа в состоянии нормы. Тем самым основные и выраженные изменения метаболизма с участием липидов в процессе смолтификации у лосося в данных экспериментальных условиях показаны для мышц. При этом у рыб из группы 24LD + КД, напротив, показано достоверное и значительное снижение липидных показателей в печени, от ОЛ до минорных фосфолипидов, что указывает на долговременную перестройку липогенеза в печени, вплоть до смолтов (март), на введенное круглосуточное освещение еще на этапе

сеголетка (сентябрь – ноябрь). Следует отметить, что доля смолтов, как показано в эксперименте, в группе 24LD + КД была меньше, чем в группах 24LD + КК и ЕстLD + КК (25% против 50 и 40% соответственно).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, введение в технологический цикл выращивания молоди лосося в условиях аквакультуры круглосуточного освещения и кормления позволяет получать жизнеспособных смолтов уже на первом году жизни, на что указывают результаты количественной оценки состава липидов. Показано, что на уровне липидного обмена после “зимнего окна” наблюдается завершение трансформационных процессов (большинство трендов имели плавный характер изменений), что в конечном счете приводит к формированию смолтов и готовности молоди лосося к переселению в морскую среду обитания. В целом результаты изменения липидного состава исследованной молоди лосося свидетельствуют о наступлении смолтификации, причем во всех группах, однако этот эффект наиболее выражен для молоди, содержащейся при круглосуточном освещении в летне-осенний сезон (группы 24LD+КК и ЕстLD+КД).

Исследование биохимических механизмов влияния дополнительного искусственного освещения на процессы роста и раннего развития лососевых рыб в аквакультуре позволяет выявлять закономерности замедленного или ускоренного роста, а также наступления периода смолтификации. Результаты этих исследований могут иметь значение не только для понимания особенностей раннего развития лососевых, но и для научного обоснования эффективности введения дополнительных факторов (в данном случае – светового режима) в технологию их выращивания в условиях аквакультуры в различных географических и климатических регионах РФ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа проведена при финансовой поддержке проекта Российского научного фонда № 19-14-00081-П “Влияние физических факторов на эффективность искусственного (заводского) воспроизводства молоди атлантического лосося *Salmo salar*: физиолого-биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Это исследование было одобрено Комитетом по биоэтике ИБ КарНЦ РАН (протокол по биоэтике №02 от 16 октября 2023 г.)

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции. М.: Мир, 1997. 624 с.

Кейтс М. Техника липидологии: Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир, 1975. 322 с.

Мурзина С.А., Провоторов Д.С., Воронин В.П., Кузнецова М.В., Курицын А.Е., Немова Н.Н. Показатели липидного обмена у сеголеток атлантического лосося *Salmo salar* в условиях аквакультуры в южном регионе РФ при разных режимах освещения и кормления // Известия РАН. Серия биологическая. 2023а. № 2. С. 134–148.

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

Немова Н.Н., Мурзина С.А., Лысенко Л.А., Мещерякова О.В., Чурова М.В., Канцерова Н.П., Нефедова З.А., Крупнова М.Ю., Пеккоева С.Н., Руоколайнен Т.Р., Веселов А.Е., Ефремов Д.А. Эколого-биохимический статус атлантического лосося *Salmo salar* L. и кумжи *Salmo trutta* L. в раннем развитии // Журн. общ. биол. 2019. Т. 80. № 3. С. 175–186.

Немова Н.Н., Нефедова З.А., Пеккоева С.Н., Воронин В.П., Руоколайнен Т.Р., Мурзина С.А. Влияние фотопериода на липидный спектр молоди атлантического лосося *Salmo salar* L. // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2020. Т. 106. № 5. С. 622–630.

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

Björnsson B. Th., Young G., Lin R.J., Defetos L.J., Bern H.A. Smoltification and seawater adaptation of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*: plasma calcitonin levels, calcium regulation and osmoregulation // Gen. Comp. Endocrinol. 1989. V. 74. P. 346–354.

Duncan N.J., Auchinachie N., Robertson D., Murray R., Bromage N. Growth, maturation and survival of out-of-season 0+ and 1+ Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts // Aquaculture. 1998. V. 168. P. 325–339.

Duston J., Saunders R.L. The entrainment role of photoperiod on hypoosmoregulatory and growth, related aspects of smolting in Atlantic salmon (*Salmo salar*) // Can. J. Zool. 1990. V. 68. № 4. P. 707–715.

Duston J., Saunders R.L. Effect of 6-, 12-, and 18-month photoperiod cycles on smolting and sexual

maturation in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1992. V. 49. P. 2273–2280.

Duston J., Saunders R.L. Advancing smolting to autumn in age 0+ Atlantic salmon by photoperiod, and long-term performance in sea water // Aquaculture. 1995. V. 135. № 4. P. 295–309.

Folch J., Lees M., Sloan-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids animal tissue (for brain, liver and muscle) // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226. P. 497–509.

Handeland S.O., Stefansson S.O. Photoperiod control and influence of body size on off-season parr-smolt transformation and post-smolt growth // Aquaculture. 2001. V. 192. P. 291–307.

Hellwig J. Defining parameters for a reproducible TLC-separation of phospholipids using ADC 2. Diploma thesis, University of Applied Sciences Northwestern Switzerland (FHNW), 2005.

Mason E.G., Gallant R.K., Wood L. Productivity enhancement of rainbow trout using photoperiod manipulation // Bull. Aquac. Assoc. Can. 1992. V. 91. P. 44–46.

Nemova N.N., Nefedova Z.A., Pekkoeva S.N., Voronin V.P., Shulgina N.S., Churova M.V., Murzina S.A. The Effect of the Photoperiod on the Fatty Acid Profile and Weight in Hatchery-Reared Underyearlings and Yearlings of Atlantic Salmon *Salmo salar* L // Biomolecules. 2020. V. 10. № 6. P. 845.

Olsen R.E., Henderson R.J. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double development HPTLC and scanning densitometry // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1989. Vol. 129. P. 189–197.

Rowe D.K., Thorpe J.E., Shanks A.M. Role of fat stores in the maturation of male Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1991. V. 48. P. 405–413.

Saunders R.L., Henderson E.B. Effects of constant day length on sexual maturation and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1988. V. 45. P. 60–64.

Sheridan M.A. Alterations in lipid metabolism accompanying smoltification and seawater adaptation of salmonid fish // Aquaculture. 1989. V. 82 (1–4). P. 191–204.

Thrush M.A., Duncan N.J., Bromage N.R. The use of photoperiod in the production of out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts // Aquaculture. 1994. V. 121. P. 29–44.

Thrush M.N., Duncan N.L., Bromage N.R. The use of photoperiod in the production of out-of season Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts // Aquaculture. 1999. V. 121. № 1–3. P. 29–44.

Wedemeyer G.A., Saunders R.L., Clarke W.C. Environmental factors affecting smoltification and early marine survival of anadromous salmonids // Mar. Fish. Rev. 1980. V. 42. P. 1–14.

Lipid Profile of Parr and Smolts of Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L.) Reared in Aquaculture under Various Lighting Regimes

**D. S. Provorotov^{1, #}, S. A. Murzina¹, V. P. Voronin¹, D. I. Manoylova¹,
M. V. Kuznetsova¹, A. E. Kuritsyn¹, N. N. Nemova¹**

*¹Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences (IB KarRC RAS),
11 Pushkinskaya Street, Petrozavodsk, Karelia, 185910 Russia*

[#]e-mail: klaydim1@mail.ru

The study of the biochemical mechanisms of the effect of additional lighting on the growth and early development of salmonids in aquaculture allows to identify patterns of slow or accelerated growth, as well as the onset of the smoltification. In this study, the results of changes in lipid status in parr and smolts of Atlantic salmon after the “winter window” (December-January) are presented. These results were obtained from three experimental groups exposed to different lighting and feeding regimes at the fingerlings stage. The changes in lipid composition of the studied young salmon indicate the onset of smoltification in all experimental groups. However, this effect is the most pronounced in the fish previously reared under continuous lighting during the summer-autumn season.

Keywords: lipids, smoltification, ontogeny, aquaculture, Atlantic salmon

ГРИБЫ В ИСТОЧНИКАХ ГРУНТОВЫХ ВОД И КОЛОДЦАХ В МОСКОВСКОМ РЕГИОНЕ

© 2024 г. А. В. Кураков*, А. А. Шумакова*, М. Д. Федорова*

*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, биологический факультет,
ул. Колмогорова, 1 строение 12, Москва, 119234 Россия

*E-mail: kurakov57@mail.ru

Поступила в редакцию 13.02.2023 г.

После доработки 03.04.2023 г.

Принята к публикации 03.04.2023 г.

Культуральным методом определена численность, видовой состав и таксономическая структура грибной биоты в грунтовых водах нескольких природных источников и колодцев в Московском регионе. Число колониеобразующих единиц (КОЕ) грибов в 1 л воды – невысокое, в среднем от 10 до 300. Из воды одного источника или колодца изолировали 6–16 видов, а всего из 6 таких объектов – 46 видов. Это были представители отдела Mucoromycota класса Mucoromycetes (*Abisidia cylindrospora* var. *nigra*, *Mucor circinelloides*, *M. hiemalis*, *Rhizopus stolonifer*), Ascomycota классов Eurotiomycetes (15 видов родов *Aspergillus* и *Penicillium*), Sordariomycetes (13 видов родов *Acremonium*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Plectosphaerella*, *Trichoderma*), Dothideomycetes (*Alternaria alternata*, *A. nobilis*, *Amorcoelophoma cassia*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum*) и Saccharomycetes (*Candida solani*, *C. zeylanoides*, *Galactomyces pseudocandidus*) и отдела Basidiomycota классов Tremellomycetes (*Mrakia gelida*, *Vishniacozyma victoriae*) и Agaricomycetes (*Phlebia acerina*, *Psathyrella candolleana*, *Thanatephorus cucumeris*). Таксономическая структура микобиоты в водах природных источников и колодцев Московского мегаполиса была в целом сходна с таковой в грунтовых водах других регионов, в том числе с выявленной в подземных водах на глубинах в несколько сотен метров. Обсуждены механизмы адаптации грибов к существованию в грунтовой воде, пути контаминации и необходимость микологических критериев для оценки качества.

Ключевые слова: грибы, видовое разнообразие, таксономическая структура, грунтовая вода, пресноводные источники, колодцы, микологический критерий

DOI: 10.31857/S1026347024010053, **EDN:** LTFZSE

Видовой состав и численность грибов в подземных водах, в их природных источниках (ключая родники, колодцах) изучены намного хуже, чем в поверхностных водоемах (озерах, реках, морях) (Воронин, 2013; Пивкин и др., 2006; Jones *et al.*, 2014; Babič *et al.*, 2016, 2017). В то же время знания о разнообразии и плотности популяций грибных организмов необходимы как с научной, так и с практической точки зрения, как правило, в связи с их использованием без какой-либо предварительной подготовки для питья и приготовления пищи (Arvanitidou *et al.*, 1999; Göttlich *et al.*, 2002; Hageskal *et al.*, 2007; Babič *et al.*, 2016, 2017).

Согласно прогностическим расчетам разнообразия грибов в пресных поверхностных водоемах и подземных водах не менее 20 000 видов, а известно только около 5% от их действительного разнообразия (Gessner, van Ryckegem, 2003; Jones *et al.*, 2014).

Недооценено видовое богатство микобиоты грунтовых вод в первую очередь в связи со слабой

изученностью, одной из причин этого является отсутствие в санитарно-эпидемиологических нормативах для оценки качества питьевой воды каких-либо грибных показателей (количественных и/или качественных). Это относится к водозаборным водоемам, подземным грунтовым водам, колодцам, природным источникам, системам городского и больничного водоснабжения (Göttlich *et al.*, 2002; Hageskal *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2007). Такая ситуация сложилась в подавляющем большинстве стран, включая Россию. Поэтому, видимо, столь мало работ по оценке состава и численности грибной биоты в сравнении с исследованиями питьевой воды по физико-химическим и микробиологическим параметрам. Данные по грибной биоте отсутствуют даже для природных источников грунтовых вод в регионах крупных мегаполисов. Для оценки качества питьевой воды давно используют разнообразные физико-химические показатели (мутность, цвет, запах, привкус,

рН, содержание нефтепродуктов, ПАВ, неорганических и органических соединений, нитратов, нитритов, тяжелых металлов), до 36 параметров (СанПиН 2.1.3684-21; СанПиН 1.2.3685-21). Принят ряд микробиологических критериев: общее микробное число не допускается более 50 колониеобразующих единиц (КОЕ) в 100 см³ и не должно быть колиформных бактерий и термотолерантных колиформных бактерий в 100 см³ воды (СанПиН 2.1.3684-21; СанПиН 1.2.3685-21).

Вместе с тем известно, что существуют грибы, которые способны придать воде неприятный привкус и запах и продуцировать аллергены и микотоксины (Sammon, Harrower, 2008). Все большее признание получают факты, что споры, переносимые водой, могут быть причиной инвазивных оппортунистических грибных инфекций у пациентов с ослабленным иммунитетом (Anaissie *et al.*, 2003; Sammon, Harrower, 2008; Sammon *et al.*, 2011). Один из путей привлечь внимание к этой проблеме — активное исследование состава и плотности популяций грибов в питьевой воде в разных регионах и странах, что позволит разработать критерии микологического контроля воды. Планировавшееся включение микроспоридий в показатели качества воды в США не было реализовано (Babič *et al.*, 2017). В Чехии и Венгрии рекомендуют проводить микроскопию водных проб после их концентрирования фильтрованием для выявления общего числа клеток эукариот и цианобактерий (Babič *et al.*, 2017). Пока количественные микологические показатели качества воды по оценке КОЕ грибов имеются только в Швеции (Hageskal *et al.*, 2007; Babič *et al.*, 2017).

Целью работы было изучение видового разнообразия и численности грибов в источниках грунтовых вод и колодцах, используемых для питья, которые расположены на территории Москвы и Московской области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы пресной грунтовой воды были отобраны из колодцев и природных источников (выходов грунтовой воды на поверхность): общественного колодца в деревне Аладьино Серпуховского района Московской области (МО), частного колодца (закрытого от внешней среды и редко используемого) в садовом товариществе (СНТ) “Тарасково” Наро-Фоминского района Московской области, в источнике в городе Мытищи Московской области, источнике “Кадочка” в парке “Коломенское” в Голосовом овраге (г. Москва), источнике в усадьбе “Знаменское-Садки”, где расположен ФГБУ “ВНИИ Экология” (г. Москва), и источнике в Битцевском парке в Москве. Отбор воды проводили в стерильные стеклянные емкости объемом 0,5–2 л (в 3 повторностях). Отбирали также грунт со дна источников в местах выхода грунтовой воды

на поверхность почвы. Температура воды в источниках и колодцах в период отбора проб (июнь — июль 2021 г.) была +5...+8°C, воздуха +22...+31°C днём и +16...+19°C ночью.

Пробы воды транспортировали в лабораторию в термосумке с охлаждающими элементами и хранили в холодильнике при +5...+8°C. Посевы на питательные среды проводили в те же или на следующие сутки. Оборудование для отбора проб соответствовало рекомендуемому ГОСТу 31942–2012.

Посев проводили на стандартные среды сусло-агар и Чапек-агар. Для подавления роста бактерий в расплавленную остывшую среду добавляли антибиотик цефотаксим в количестве 50 мг на 500 мл среды. Выделение чистых культур из появляющихся колоний начинали после трех-пяти суток инкубации чашек и продолжали в течение 2–3 недель. Посев из грунта проводили путем нанесения его комочков на поверхность среды стерильным ланцетом и сверху дополнительно посыпали порошком цефотаксима.

Проводили глубинный посев воды в аликвотах 0,5, 1, 2 и 3 мл в стерильные чашки Петри, после чего в них заливали питательную среду и обрачивали пленкой для предохранения контаминации среды и высыхания. При таком посеве на большинстве чашек отсутствовали колонии грибов. Только в редких случаях на 1–2 чашках из 10 вырастали одна-две колонии вне зависимости от источника и колодца. Поэтому изучение состава и численности КОЕ грибов в этих объектах было продолжено путем фильтрации воды для концентрации грибных пропагул на фильтрах. Использовали целлюлозные фильтры (синяя лента, диаметр пор 2–3 мкм), а также мембранные фильтры из нитрата целлюлозы (поры 0,45 мкм) в шприце (производство Millipore, Germany). Фильтр (синяя лента) помещали на стеклянную воронку, которая была вставлена в колбу, закрывали сверху стерильной фильтровальной бумагой и профильтровывали нужный объем воды, установленный в предварительных экспериментах (как правило, 100 или 250 мл, реже 0,5 и 0,75 л). При таком посеве число колоний в чашках было оптимальное — в подавляющем большинстве случаев в диапазоне 7–20.

Фильтры разрезали простерилизованными в пламени газовой горелки ножницами на 4 равные части или же использовали целиком, если они были малого размера, и помещали на поверхность питательных сред. Проводили также посевы из профильтрованной воды, чтобы полнее выявить число и состав грибов, и эти данные учитывали при оценке видового богатства грибов в пробах.

Посевы провели из отобранной пробы не менее чем на 10 чашек Петри, и общая повторность составила 30–40 чашек Петри из каждого водного объекта. Подсчёт грибных колоний и выделение

Таблица 1. Количество КОЕ грибов в воде источников и колодцев

Объект	Местоположение	Диапазон варьирования КОЕ грибов в 1 л	Среднее число КОЕ грибов в 1 л
Источник	Парк “Коломенское”, Москва	35–530	310 ± 160
Источник	Битцевский парк, Москва	60–100	80 ± 20
Источник	Парк в усадьбе “Знаменское-Садки” на территории ВНИИ Экология, Москва	10–20	13 ± 7
Источник	Мытищи, МО	40–200	123 ± 60
Колодец	д. Аладыно, Серпуховской р-н, МО	34–236	123 ± 77
Колодец	СНТ “Тарасково”, Наро-Фоминский р-н, МО	30–50	35 ± 15

изолятов проводили через 10–14 суток инкубации посевов при +10...+12°C.

Для видовой идентификации отбирали по несколько колоний разного морфотипа. Если были сомнения, что колонии могут принадлежать не к одному, а к разным видам, то изолировали культуры из обеих колоний. Для каждого варианта (водного объекта) подсчитывали общее количество колоний и количество колоний каждого культурально-морфологического типа. Из проб каждого водного объекта были выделены все морфотипы, что составляло из каждого варианта не менее 40 культур, часть из которых были одного вида.

Идентификация штаммов грибов была проведена с использованием культурально-морфологических и молекулярно-генетических подходов. Описание культур проводили на сусло-агаре и среде Чапека с использованием рекомендуемых для соответствующего таксона определителей (Raper, Fennell, 1965; Raper *et al.*, 1968; Rifai, 1969; Schipper, 1978; Klich, 2002; Crous *et al.*, 2007; Domsch *et al.*, 2007; Samson, Naubraken, 2011; Seifert *et al.*, 2011) и по генетическим признакам с помощью ПЦР и дальнейшего секвенирования ITS-региона рДНК. ДНК выделяли из 3-суточных культур дрожжей и 5–7-суточных мицелиальных грибов, выращенных на сусло-агаре. Использовали набор “Проба-Экспресс” (“Синтол”, кат. номер EX-517) и следующий протокол: 50–100 мг грибной биомассы поместить в пробирку объемом 1,5 мл и гомогенизировать; добавить 300 мкл лизирующего буфера и тщательно перемешать; поместить в термостат на 95°C на 10 минут; добавить 30 мкл осаждающего раствора и тщательно перемешать; центрифугировать 13 000 об/мин в течение 1 минуты; отобрать супернатант в чистую маркированную пробирку. Для постановки ПЦР использовали готовую реакционную смесь производства “Синтол” (кат. номер M-428) и универсальные праймеры ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) и ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). Реакцию проводили по следующей циклограмме: 96°C – 5 минут; 30 циклов: 94°C – 20 секунд; 57°C – 30 секунд;

72°C – 1 минута. Качественную и количественную оценку результатов ПЦР выполняли с помощью электрофореза в агарозном геле. Очистку реакционной смеси от остатков праймеров и свободных трифосфатов проводили смесью ферментов ExoI и FastSAP (Fermentas). Секвенирование ITS рДНК по Сенгеру выполняли на генетическом анализаторе ABI 3130xl в компании “Синтол” (Москва) с использованием набора BigDye v3.1 (ThermoFisher) согласно руководству пользователя и инструкции к набору. Видовую принадлежность полученных последовательностей определяли в сервисе BLAST на сайте NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Современное таксономическое положение видов дано по базе данных: Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>).

Во всех опытах подсчитывали число колониеобразующих единиц (КОЕ) грибов в 1 л воды и относительное обилие видов (доля КОЕ определенного вида от общего числа других видов в данной пробе или водном объекте). Рассчитывали средние значения данных и коэффициент вариации данных (отношение стандартного отклонения к среднему значению) (Excel 2016). Для оценки сходства и различий видового состава грибов в грунтовой воде рассчитывали коэффициент Сьеренсена (Мэгаран, 1992).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Численность грибов в воде источников и колодцев Московского региона варьировала в диапазоне от 10 до 530 КОЕ в 1 л (табл. 1). Согласно санитарно-эпидемиологическим рекомендациям для питьевой воды, принятым в Швеции (не более 1000 КОЕ грибов в 1 л), вода из исследованных водных объектов не превышает допустимую норму (NFA, SLVFS 2001:30).

Минимальное число КОЕ грибов установлено в воде источника в малопосещаемом парке усадьбы “Знаменское-Садки” на территории ВНИИ Экология (Москва) и в колодце на частном участке

в садовом товариществе “Тарасково” Наро-Фоминского района МО. Грунтовая вода в колодце в деревне Аладыно МО и других источниках (парк в “Коломенском” и Битце) имели более высокую численность грибов. Связано это, видимо, со значительно большей известностью и доступностью данных источников. Они активно используются москвичами, а общественный колодец в Аладыно больше времени находится в открытом состоянии, из него намного чаще набирают воду, чем из частного колодца в СНТ “Тарасково”. Это приводит к увеличению взмученности воды, попаданию грибов из грунта, с которым контактирует грунтовая вода источников и в меньшей мере в колодцах. Из атмосферы попадание грибов в воду, конечно, не исключается. Но следует подчеркнуть, что новая грунтовая вода поступает непрерывно в источники и колодцы, и они расположены в чистых районах (парках), а колодцы содержат в закрытом виде. Роль каждого из этих факторов в определении состава и количества грибов в воде может существенно варьировать и в каждом случае требует дальнейших исследований.

Из воды колодцев, источников и донного грунта изолировано 118 и 45 чистых культур грибов разных морфотипов соответственно. После исключения повторных изолятов одного морфотипа для видовой идентификации взято 65 штаммов. Все они были определены до вида на основе культурально-морфологических признаков, а 48 из них также на основе секвенирования ITS рДНК (табл. 2–5).

В табл. 2 приведены результаты молекулярно-генетической идентификации 34 штаммов и их номера депонирования в Генбанке.

У части изолятов из воды и грунта видовая принадлежность была установлена на основе культурально-морфологических признаков. Это были штаммы *Alternaria nobilis* (Vize) E. G. Simmons (АИ 2.2), *Penicillium citronigrum* Dierckx (АИ 0,25 1.1), *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries (МРИ 1.8), *Aspergillus niger* Tiegh. (МР 0,75 1.1), *Plectosphaerella plurivora* A.J.L. Phillips, A. Carlucci & M. L. Raimondo (МРИ 1.7), *Fusarium moniliforme* J. Sheld. (АИ 0,25 1.3), *Aspergillus niger* (АИ 0,25 2.1), *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. (АИ 0,25 2.5; АИ 0,25 4.2), *Aspergillus fumigatus* Fresen. (АИ 0,25 2.4), *A. flavus* (МРИ 3.1 и 3.2), *Acremonium potronii* Vuill. (МРИ 3.3), *Penicillium chrysogenum* (АИ 0,25 3.3 и МРИ 1.1), *Chaetomium* sp. Kunze (АИ 0,75 4), *Mucor circinelloides* Tiegh. (Tap) и ряд других. В итоге в грунтовой воде источников и колодцев было выявлено 46 видов и 22 вида грибов в грунте со дна 3 источников (табл. 3–6).

Таксономическая структура микобиоты в грунтовых водах колодцев и природных источников Москвы и Московской области представлена видами отдела Mucoromycota класса Mucoromycetes,

отдела Ascomycota классов Eurotiomycetes, Sordariomycetes, Dothideomycetes, Saccharomycetes и отдела Basidiomycota классов Agaricomycetes, Tremellomycetes (табл. 3). Наибольшее число видов (37) в грунтовых водах источников и колодцев принадлежало к отделу Ascomycota. Максимальным разнообразием — 15 видами родов *Aspergillus* P. Micheli ex Haller и *Penicillium* Link — характеризовался класс Eurotiomycetes и 13 видами родов *Acremonium* Link, *Chaetomium*, *Fusarium* Link, *Myrothecium* Tode, *Plectosphaerella* Kleb., *Trichoderma* Pers. класс Sordariomycetes. Затем следовал класс Dothideomycetes с 6 видами и класс Saccharomycetes с 3 видами (*Candida solani*, *C. zeylanoides*, *Galactomyces pseudocandidus*) (табл. 3). Выявленные в этих водных объектах представители отдела Basidiomycota относились к классу Tremellomycetes (*Mrakia gelida*, *Vishniacozyma victoriae*) и классу Agaricomycetes (*Phlebia acerina*, *Psathyrella candolleana* (Fr.) Maire, *Thanatephorus cucumeris*). Грибы отдела Mucoromycota класса Mucoromycetes были представлены 4 видами — *Absidia cylindrospora* var. *nigra*, *Mucor circinelloides*, *M. hiemalis* и *Rhizopus stolonifer* (табл. 3).

Сравнительный анализ состава видов в исследованных источниках и колодцах показал, что характерными для этих экотопов, выявленными в большинстве из них, являются грибы *Mrakia gelida*, родов *Aspergillus* (*A. niger*), *Cladosporium* Link, *Penicillium* (*P. chrysogenum*), *Fusarium* (*F. oxysporum*), *Trichoderma* (*T. harzianum*), *Candida* Berkhout, *Alternaria* Nees и порядка Mucorales (*Mucor hiemalis*, *Rhizopus stolonifer*) (табл. 3). Виды *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor hiemalis*, *Trichoderma harzianum*, *T. atroviride*, *T. citrinoviride*, *Aspergillus* spp., *Fusarium oxysporum*, *Candida zeylanoides*, *Mrakia gelida* характеризовались наибольшим относительным обилием в пробах воды из источников и колодцев. Число КОЕ этих таксонов грибов варьировало в диапазоне от единиц до двух десятков КОЕ в 1 л в разных водных объектах (табл. 5).

Между данными водными объектами обнаружены заметные отличия. Они выражаются как в составе грибов, так и в их видовом разнообразии в источниках и колодцах. Это подтверждают коэффициенты сходства Сьеренсена между микобиотой изученных экотопов, они не превышают 20–35% в большинстве случаев. Так, в воде колодца д. Аладыно и “Тарасково” отмечено выше, чем в других водных объектах, разнообразие микромицетов рода *Trichoderma*, в колодце д. Аладыно также больше видов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, в источниках в г. Мытищи рода *Cladosporium* (табл. 3). Многие виды были обнаружены только в определенном источнике или колодце. По числу КОЕ разных таксонов изученные объекты также различаются, что ясно демонстрируют данные табл. 5.

Различия в видовом богатстве грибов в целом соответствовали тем, что были обнаружены в их

Таблица 2. Филогенетическая принадлежность штаммов грибов на основе нуклеотидной последовательности ITS рДНК

№ штамма	Вид	№ в Генбанке	Сходство, %	Объект, расположение
SH2	<i>Thanatephorus cucumeris</i> (A. B. Frank) Donk	OP596489	98.75	Водный источник, Мытищи, МО
SH3	<i>Aspergillus flavus</i> Link	OP596490	98.33	Грунт в водном источнике, Мытищи, МО
SH4	<i>Thanatephorus cucumeris</i>	OP596491	98.82	Грунт в водном источнике, Мытищи, МО
SH5	<i>Mrakia gelida</i> (Fell, Statzell, I. L. Hunter & Phaff) Y. Yamada & Komag.	OP596492	99.68	Водный источник, Мытищи, МО
SH6	<i>Trichoderma atroviride</i> P. Karst.	OP596493	98.34	Водный источник, Мытищи, МО
SH8	<i>Penicillium sacculum</i> E. Dale	OP596494	99.82	Водный источник, Мытищи, МО
SH9	<i>Myrothecium cinctum</i> (Corda) Sacc.	OP596495	98.04	Водный источник, Мытищи, МО
SH10	<i>Vishniacozyma victoriae</i> (M. J. Montes, Belloch, Galiana, M. D. García, C. Andrés, S. Ferrer, Torr.-Rodr. & J. Guinea) Xin Zhan Liu, F. Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout	OP596496	98.61	Водный источник, Мытищи, МО
SH11	<i>Trichoderma atroviride</i>	OP596497	99.64	Водный источник, Мытищи, МО
SH12	<i>T. longibrachiatum</i> Rifai	OP596498	99.83	Водный источник, Мытищи, МО
SH13	<i>T. citrinoviride</i> Bissett	OP596499	98.15	Колодец, д. Аладьино, Серпуховской р-н, МО
SH14	<i>Mrakia gelida</i>	OP596500	98.95	Колодец, д. Аладьино, Серпуховской р-н, МО
SH15	<i>Phlebia acerina</i> Peck	OP596501	99.99	Колодец, д. Аладьино, Серпуховской р-н, МО
SH16	<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	OP596502	100	Колодец, д. Аладьино, Серпуховской р-н, МО
SH17	<i>A. oryzae</i> (Ahlb.) Cohn	OP596503	99.65	Колодец, д. Аладьино, Серпуховской р-н, МО
SH18	<i>Penicillium corylophilum</i> Dierckx	OP596504	99.40	Колодец, д. Аладьино, Серпуховской р-н, МО
SH19	<i>Cytospora leucostoma</i> (Pers.) Sacc.	OP596505	99.66	Водный источник, парк "Коломенское", Москва
SH20	<i>Penicillium expansum</i> Link	OP596506	98.64	Водный источник, парк "Коломенское", Москва
SH21	<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	OP596507	99.35	Водный источник, парк "Коломенское", Москва
SH23	<i>Penicillium restrictum</i> J. C. Gilman & E. V. Abbott	OP596508	99.81	Водный источник, парк "Коломенское", Москва
SH24	<i>Fusarium tricinctum</i> (Corda) Sacc.	OP596509	99.82	Водный источник, парк "Коломенское", Москва
SH27	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.	OP596510	100.00	Водный источник, Битцевский парк, Москва
SH28	<i>Mrakia gelida</i>	OP596511	100.00	Водный источник, Битцевский парк, Москва
SH30	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl.	OP596512	99.80	Водный источник, Битцевский парк, Москва

Таблица 2. (Окончание)

№ штамма	Вид	№ в Генбанке	Сходство, %	Объект, расположение
SH32	<i>F. oxysporum</i>	OP596513	100.00	Водный источник, Парк в усадьбе “Знаменское-Садки”, Москва
SH33	<i>Myrothecium leucotrichum</i> (Peck) M. C. Tulloch	OP596514	99.47	Водный источник, парк в усадьбе “Знаменское-Садки”, Москва
SH34	<i>Candida zeylanoides</i> (Castell.) Langeron & Guerra	OP596515	99.66	Водный источник, парк в усадьбе “Знаменское-Садки”, Москва
SH35	<i>Phoma herbarum</i> Westend.	OP596516	98.28	Водный источник, парк в усадьбе “Знаменское-Садки”, Москва
SH36	<i>Mucor hiemalis</i>	OP596517	98.73	Водный источник, парк в усадьбе “Знаменское-Садки”, Москва
SH39	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	OP596518	99.12	Водный источник, парк в усадьбе “Знаменское-Садки”, Москва
SH41	<i>Penicillium goetzii</i> J. Rogers, Frisvad, Houbraken & Samson	OP596519	99	Водный источник, парк в усадьбе “Знаменское-Садки”, Москва
SH43	<i>Trichoderma citrinoviride</i> Bissett	OP596520	100	Колодец, СНТ “Тарасково”, Наро-Фоминский р-н, МО
SH44	<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	OP596521	100	Колодец, СНТ “Тарасково”, Наро-Фоминский р-н, МО
SH47	<i>Trichoderma harzianum</i>	OP596522	99.83	Колодец, СНТ “Тарасково”, Наро-Фоминский р-н, МО
Sh7	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	—*	97.34	Водный источник, Мытищи, МО
Sh26	<i>Candida solani</i> Lodder & Kreger	—	97.25	Водный источник, Битцевский парк, Москва
Sh29	<i>Galactomyces pseudocandidum</i> de Hoog & M. T. Sm.	—	95.45	Водный источник, Битцевский парк, Москва
SH31	<i>Absidia cylindrospora</i> var. <i>nigra</i> Hesselt. & J. J. Ellis	—	94.45	Водный источник, парк в усадьбе “Знаменское-Садки”, Москва
Sh42	<i>Penicillium goetzii</i>	—	97.35	Колодец, СНТ “Тарасково”, Наро-Фоминский р-н, МО
Sh46	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	—	97.55	Колодец, СНТ “Тарасково”, Наро-Фоминский р-н, МО
Sh48	<i>T. citrinoviride</i>	—	97.33	Колодец, СНТ “Тарасково”, Наро-Фоминский р-н, МО

* Нуклеотидные последовательности штаммов не депонировали в Генбанк.

общей численности в этих водных объектах. В тех пробах грунтовой воды, где выше общее число КОЕ грибов, как правило, видовое разнообразие было больше.

Максимальное разнообразие грибов выявлено в пробах грунтовой воды из источников в г. Мытищи МО и из колодца в деревне Аладыно Серпуховского района МО — по 16 видов (табл. 3). Наименьшее количество видов было в пробах воды из колодца с частного участка в садовом товариществе “Тарасково” Наро-Фоминского района МО — 6 видов. Из воды источника в парке “Знаменское-Садки” в Москве выделено 10 видов, а из источников в парке “Коломенское”

и Битцевском парке Москвы по 10 и 11 видов соответственно.

Состав грибов в воде в значительной мере сходен с таковым в грунте источника, об этом свидетельствуют данные в табл. 3 и 6, и подтверждают довольно высокие (не менее 60%) коэффициенты сходства Сьеренсена. Это указывает на донный грунт как существенный источник контаминации грибами воды.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В обследованных источниках грунтовых вод и колодцах Москвы и Московской области

Таблица 3. Таксономическая принадлежность грибов в природных источниках грунтовых вод и колодцах

Вид	Класс	Отдел
<i>Absidia cylindrospora</i> var. <i>nigra</i> <i>Mucor circinelloides</i> <i>M. hiemalis</i> <i>Rhizopus stolonifer</i>	Mucoromycetes	Mucoromycota
<i>Alternaria alternata</i> <i>A. nobilis</i> <i>Amorocoelophoma cassia</i> Jayasiri, E.B.G. Jones & K. D. Hyde <i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>C. sphaerospermum</i> <i>Phoma herbarum</i>	Dothideomycetes	Ascomycota
<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. fumigatus</i> <i>A. niger</i> <i>A. oryzae</i> <i>A. versicolor</i> <i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx <i>P. chalaybudae</i> Visagie <i>P. chrysogenum</i> <i>P. citreonigrum</i> <i>P. corylophilum</i> <i>P. glabrum</i> (Wehmer) Westling <i>P. goetzii</i> <i>P. expansum</i> <i>P. restrictum</i> <i>P. sacculum</i>	Eurotiomycetes	
<i>Candida solani</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>Galactomyces pseudocandidus</i>	Saccharomycetes	
<i>Acremonium potronii</i> <i>Chaetomium</i> sp. <i>Cytospora leucostoma</i> <i>Fusarium moniliforme</i> <i>F. oxysporum</i> <i>F. tricinctum</i> <i>Myrothecium cinctum</i> <i>M. leucotrichum</i> <i>Plectosphaerella plurivora</i> <i>Trichoderma atroviride</i> <i>T. citrinoviride</i> <i>T. harzianum</i> <i>T. longibrachiatum</i>	Sordariomycetes	
<i>Mrakia gelida</i> <i>Vishniacozyma victoriae</i>	Tremellomycetes	Basidiomycota
<i>Phlebia acerina</i> <i>Psathyrella candolleana</i> <i>Thanatephorus cucumeris</i>	Agaricomycetes	

Таблица 4. Видовой состав грибов в грунтовой воде из источников и колодцев

Вид	Номера источников и колодцев*					
	1	2	3	4	5	6
<i>Absidia cylindrospora</i> var. <i>nigra</i>	—**	—	—	—	+	—
<i>Acremonium potronii</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Alternaria alternata</i>	+	—	—	—	—	—
<i>A. nobilis</i>	—	+	—	—	—	—
<i>Amorocoelophoma cassiae</i>	—	—	—	—	+	—
<i>Aspergillus flavus</i>	+	—	+	+	—	—
<i>A. fumigatus</i>	—	+	—	—	—	—
<i>A. niger</i>	+	+	+	+	+	—
<i>A. oryzae</i>	—	+	—	—	—	—
<i>A. versicolor</i>	—	+	—	—	—	—
<i>Candida solani</i>	—	—	—	+	—	—
<i>C. zeylanoides</i>	—	—	—	—	+	—
<i>Chaetomium</i> sp.	—	+	—	—	—	—
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	+	+	+	+	—	—
<i>C. sphaerospermum</i>	—	—	—	+	—	—
<i>Cytospora leucostoma</i>	—	—	+	—	—	—
<i>Fusarium moniliforme</i>	—	+	—	—	—	—
<i>F. oxysporum</i>	—	—	—	+	+	—
<i>F. tricinctum</i>	—	—	—	+	—	—
<i>Galactomyces pseudocandidus</i>	—	—	—	+	—	—
<i>Mrakia gelida</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Mucor circinelloides</i>	—	—	—	—	—	+
<i>M. hiemalis</i>	+	—	+	—	+	—
<i>Myrothecium cinctum</i>	+	—	—	—	—	—
<i>M. leucotrichum</i>	—	—	—	—	+	—
<i>Penicillium brevicompactum</i>	+	—	—	—	—	—
<i>P. chalabudae</i>	+	—	—	—	—	—
<i>P. chrysogenum</i>	—	+	—	+	—	+
<i>P. citreonigrum</i>	—	+	—	—	—	—
<i>P. corylophilum</i>	—	—	+	—	—	—
<i>P. glabrum</i>	—	+	—	—	—	—
<i>P. goetzii</i>	—	—	—	—	—	+
<i>P. expansum</i>	—	—	+	—	—	—
<i>P. restrictum</i>	—	—	+	—	—	—
<i>P. sacculum</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Phlebia acerina</i>	—	+	—	—	—	—
<i>Phoma herbarum</i>	—	—	—	—	+	—
<i>Plectosphaerella plurivora</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Psathyrella candolleana</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Rhizopus stolonifer</i>	—	+	+	+	—	—
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Trichoderma atroviride</i>	+	—	—	—	—	—
<i>T. citrinoviride</i>	—	+	—	—	—	+
<i>T. harzianum</i>	—	—	—	—	+	+
<i>T. longibrachiatum</i>	—	+	—	—	—	—
<i>Vishniacozyma victoriae</i>	+	—	—	—	—	—
Число видов	16	16	10	11	10	6

* 1 — источник, г. Мытищи, МО, 2 — колодец, д. Аладыно, Серпуховской район, МО, 3 — источник, парк “Коломенское”, г. Москва, 4 — источник, Битцевский парк, г. Москва, 5 — источник, парк в усадьбе “Знаменское-Садки”, г. Москва, 6 — колодец, СНТ “Тарасково” Наро-Фоминского района МО, ** выявлен вид +, не обнаружен —.

Таблица 5. Численность грибов часто встречающихся таксонов в воде источников и колодцев

Таксон	Номера источников и колодцев*					
	1	2	3	4	5	6
	КОЕ/л					
<i>Aspergillus spp.</i>	12	25	1	4	2	
<i>Candida zeylanoides</i>	**			3		
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	1	1	1		
<i>Fusarium oxysporum</i>		3			4	4
<i>Mrakia gelida</i>	6	6	1	2	1	4
<i>Mucor spp.</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i>	1	4	9	3	2	1
<i>Penicillium spp.</i>	18	21	20	7	6	7
<i>Trichoderma spp.</i>	12	7			4	5

* 1 — источник, г. Мытищи, МО, 2 — колодец, д. Аладьино, Серпуховской район МО, 3 — источник, парк “Коломенское”, г. Москва, 4 — источник, Битцевский парк, г. Москва, 5 — источник, парк в усадьбе “Знаменское-Садки”, г. Москва, 6 — колодец, СНТ “Тарасково” Наро-Фоминского района МО.

** пустая клетка — вид не обнаружен или его численность ниже 1 КОЕ/л

количество культивируемых грибов варьировало в среднем от 10 до 300 КОЕ в 1 л. Эти значения не превышают, а в несколько раз ниже показателей числа КОЕ грибов в 1 л питьевой воды, принятых в Швеции (Babič *et al.*, 2017). В России, как и большинстве стран, количественные микологические критерии для такой оценки воды отсутствуют.

В составе микобиоты в изученных источниках грунтовых вод и колодцев не обнаружено первично водных зооспоровых грибов отделов Chytridiomycota, Rozellomycota и родственных таксонов. Это, возможно, связано с тем, что в работе не использовали необходимые для их выделения специальные среды и методы приманок и метагеномный подход. Вместе с тем эти грибы к тому же и не могут быть обильно представлены в подземных водах. Многие из них паразиты на других организмах или используют для питания специфические субстраты (Gleason *et al.*, 2010). Это подтверждают и данные по изучению микобиоты в источниках грунтовых вод в Исландии с использованием ДНК-баркодинга (Wurzbacher *et al.*, 2020). Применение метагеномного подхода показало, что число операционных таксономических единиц (ОТЕ) представителей отделов Chytridiomycota и Rozellomycota в них в отличие от поверхностных вод, было крайне мало или их не обнаруживали (Wurzbacher *et al.*, 2020). Сходные результаты о хитридиомикетах получены для грунтовых вод с больших глубин (Sohlberg *et al.*, 2015).

Среди грибов, выявленных нами в источниках грунтовых вод и колодцах, подавляющее большинство — наземные виды, но есть ряд таких, которые регулярно встречаются в подземных водах, водоемах и реках. Наиболее часто из грунтовой воды мы

изолировали *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma atroviride*, *T. citrinoviride*, *Cladosporium cladosporioides*, *T. harzianum*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Candida zeylanoides*, реже родов *Absidia* Tiegh., *Acremonium*, *Alternaria*, *Galactomyces* Redhead & Malloch, *Phoma* Sacc. и ряд других. Наряду с аскомицетами постоянно выделяли из грунтовых вод виды отдела Mucoromycota — *Mucor hiemalis*, *M. circinelloides*, *Rhizopus stolonifer*, *Absidia cylindrospora* var. *nigra*. Из базидиомицетов были обнаружены тремеломицеты (*Mrakia gelida*, *Vishniacozyma victoriae*), выявление агарикомицетов обусловлено, по всей очевидности, нахождением источников в крупных парковых зонах, где эти грибы обитают и их споры попадают в воду.

Грибы данных таксонов выделяли из грунтовых вод в других регионах мира (Babič *et al.*, 2017). В первую очередь, как и в нашем случае, грибы аскомицетного аффинитета родов *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Beauveria* Vuill., *Chrysosporium* Corda, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geomyces* Traaen, *Geotrichum* Link, *Gliocladium* Corda, *Graphium* Corda, *Paecilomyces* Bainier, *Penicillium*, *Scedosporium* Sacc. ex Castell. & Chalm., *Scopulariopsis* Bainier, *Sepedonium* Link, *Stachybotrys* Corda, *Trichoderma* u *Verticillium* Nees (Wurzbacher *et al.*, 2011; Krauss *et al.*, 2011), отдела Mucoromycota родов *Absidia*, *Mortierella* Coem., *Mucor* Fresen., *Rhizopus* Ehrenb. и *Umbelopsis* Amos & H. L. Barnett (Frankova, Horecka, 1995; Arvanitidou *et al.*, 1999; Göttlich *et al.*, 2002; Goncalves *et al.*, 2006; Hayette *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2013; Babič *et al.*, 2016), а из базидиомицетов — тремеломицетов и дрожжей (Frankova, Horecka, 1995; Arvanitidou *et al.*, 1999; Göttlich *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2010).

Обнаруженные нами таксоны грибов были выявлены в подземных водах и на очень больших глубинах — 296–798 м — в Финляндии (Sohlberg *et al.*, 2015). Большинство нуклеотидных последовательностей грибов в грунтовой воде на этих глубинах принадлежало к отделу Ascomycota, в меньшей мере отделу Basidiomycota и редко — Chytridiomycota. Доминирующими классами аскомицетов в глубоких водоносных горизонтах коренных пород были Sordariomycetes, Eurotiomycetes, Dothideomycetes, а среди базидиомицетов виды классов Microbotryomycetes и Tremellomycetes (Sohlberg *et al.*, 2015). Эти данные почти полностью соответствуют той таксономической структуре грибной биоты, что установлена нами в грунтовых водах природных источников и колодцев Московского региона (табл. 3).

Грунтовые воды имеют определенную специфику в физико-химических условиях, к которым должны приспосабливаться грибы. Они характеризуются олиготрофными, низкотемпературными условиями, ограниченным поступлением кислорода и органических веществ фототрофов (растений, водорослей), но в них может быть больше, чем в поверхностных водоемах, содержание неорганических соединений. Однако небольшие количества в основном моно- или полисахаридами попадают в грунтовые воды из остатков бактериальных биопленок (Sohlberg *et al.*, 2015).

Вышеуказанные виды в большинстве своем обнаруживают не только в грунтовых водах и водоемах, но чаще в почвах разных типов, растениях, субстратах животного происхождения (Domsch *et al.*, 2007). Но многие из них при попадании в воду способны там длительно существовать и функционировать, адаптированы к анаэробным и олиготрофным условиям и гипоксии, повышенному содержанию диоксида углерода, способны к спиртовому брожению, могут переходить к дрожжевому росту (Кураков и др., 2007; 2011; Головченко и др., 2013; Domsch *et al.*, 2007). Важный факт — это наличие грибов в грунтовых водах даже на большой глубине (Sohlberg *et al.*, 2015). Исследование физиологических свойств грибов, выделенных традиционными методами культивирования из этих экотопов, указывает на то, что они адаптированы и способны расти в подземной водной среде (Ekendahl *et al.*, 2003). Известно, что виды рода *Fusarium* присутствуют в воде в составе биопленок. Они не только выдерживают недостаток кислорода, но и растут в анаэробных условиях путем адаптации своего метаболизма и формы роста (Кураков и др., 2007; Wurzbacher *et al.*, 2011). Виды из родов *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Nectria* (Fr.) Fr., *Fusarium* и *Penicillium*, растущие как факультативные анаэробы, используют нитрат или нитрит в качестве альтернативных конечных акцепторов электронов в отсутствие кислорода (Кураков и др., 1997; Shoun

et al., 1992). Некоторые виды *Mucor* переходят в дрожжеподобную форму в анаэробных условиях (Кураков и др., 2007; Domsch *et al.*, 2007). *Mrakia gelida*, характерный для грунтовых вод Московского региона, является психрофильным видом, широко распространен в холодных местообитаниях, в арктических, альпийских водных и наземных экосистемах. Обнаружено, что грибы активны и продуцируют рибосомы в подземной олиготрофной водной среде (Miettinen *et al.*, 2015).

Знание специфики микобиоты в этой подземной водной эконше и путей грибной контаминации воды актуально как с научной, так и санитарно-эпидемиологической точки зрения, и необходимы дальнейшие исследования в этом направлении.

Многие виды грибов могут попасть в воду из грунта, через который проходит водоток, о чем свидетельствуют данные посевов из них (табл. 6). В большей мере это происходит, если источник довольно энергично выбрасывает воду и поднимает со дна различные минеральные и органические частицы с сорбируемыми на них микроорганизмами. В колодцах воды часто чище, так как частицы грунта постепенно осаждаются на дно. Определенный вклад в состав микобиоты вносят и виды из воздуха, но при отборе только что вышедшей на поверхность грунтовой воды или в случае закрытых колодцев он, видимо, небольшой.

Для установления, насколько меняется микобиота в отбираемых пробах питьевой воды в источниках и колодцах от той, что есть исходно в грунтовых водах под землей, и насколько значима контаминация её грибами из грунта, почвы и воздуха в месте выхода на поверхность, нужны дополнительные исследования. Это важно, так как в воде источников и колодцев, как и в нашем случае, регулярно выявляются виды, потенциально опасные для иммунокомпетентных людей.

Условно-патогенные грибы быстро используют в своих интересах ослабленную иммунную систему, вызванную такими заболеваниями, как ВИЧ/СПИД, или медикаментозной терапией, связанной, например, с трансплантацией органов и лечением рака (Sammon, Harrover, 2008). Наличие в воде микромицетов родов *Acremonium* и *Penicillium* способно изменить ее вкус и запах. Грибы *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida*, *Fusarium*, мукоровые, встречающиеся часто в водных источниках, могут у иммунокомпетентных людей вызвать заболевания почек, расстройств печени, ухудшение состояния ожогов, усиление отитов и способны вызывать аллергии, астму и другие заболевания человека (Babič *et al.*, 2017). Виды фузариоза вызывают широкий спектр инфекций у людей, включая поверхностные и локально инвазивные заболевания. Основными воротами проникновения для *Fusarium* spp. являются дыхательные пути,

Таблица 6. Видовой состав грибов в грунте со дна источников

Вид	Номера источников*		
	1	3	5
<i>Absidia cylindrospora</i> var. <i>nigra</i>	—**	—	+
<i>Acremonium potronii</i>	+	—	—
<i>Amorocoelephoma cassiae</i>	—	—	+
<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	—
<i>Candida zeylanoides</i>	—	—	+
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	+	+	—
<i>Fusarium oxysporum</i>	—	—	+
<i>Mucor hiemalis</i>	—	+	+
<i>Myrothecium cinctum</i>	+	—	—
<i>M. leucotrichum</i>	—	—	+
<i>Penicillium brevicompactum</i>	+	—	—
<i>P. chalabudae</i>	+	—	—
<i>P. chrysogenum</i>	+	—	+
<i>P. expansum</i>	—	+	—
<i>P. restrictum</i>	—	+	—
<i>P. sacculum</i>	+	—	—
<i>Phoma herbarum</i>	—	—	+
<i>Plectosphaerella plurivora</i>	+	—	—
<i>Psathyrella candolleana</i>	+	—	—
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	+	—	—
<i>Trichoderma harzianum</i>	—	—	+
<i>Vishniacozyma victoriae</i>	+	—	—

* 1 — источник, г. Мытищи, МО, 3 — источник в парке “Коломенское”, г. Москва, 5 — источник в парке “Знаменское-Садки”, г. Москва, ** — вид не обнаружен, + вид выявлен.

за которыми следует кожа в месте разрушения тканей и, возможно, слизистые оболочки. Установлено, что принятие душа водой, загрязненной грибами родов *Alternaria*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Paecilomyces* и *Penicillium*, регулярно вызывало проявление астмы и раздражение кожи у пациентов (Anaissie *et al.*, 2003).

Отсутствие интереса к этим проблемам, возможно, связано и с коварной природой оппортунистических грибных инфекций человека (не столь явной на начальной стадии) по сравнению с передаваемыми через воду эпидемическими заболеваниями, вызываемыми патогенными бактериями, вирусами и протистами. Для скорейшего их признания, а тенденция этого в мире существует, и введения микологических критериев в оценку качества воды необходимы как дальнейшие исследования, так и заинтересованность санитарной службы, организаторов системы здравоохранения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение 075-15-2021-1396).

Бюджетная тема «Экофизиология, цитология и генетика грибов как основа разумной природы менеджмент и биотехнологии» Государственная регистрация № (ЕГИСУ НИОКР) 121032300079-4, грант РФФИ (Проект № 18-29-25073).

ЭТИЧЕСКОЕ ОДОБРЕНИЕ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Воронин Л.В. Оппортунистические грибы в пресноводных экосистемах // Ярославский педагогический вестник. 2013. Т. 3 (Естественные науки). № 2. С. 67–74.

- Головченко А.В., Кураков А.В., Семенова Т.А., Звягинцев Д.Г. Обилие, разнообразие, жизнеспособность и факторная экология грибов в торфяниках // Почвоведение. 2013. № 1. С. 80–97.
- ГОСТ 31942–2012. Вода. Отбор проб для микробиологического анализа. Официальное издание. М.: Стандартинформ, 2019. 23 с.
- Кураков А.В., Лаврентьев Р.Б., Соина В.С. Культурально-морфологические особенности роста мицелиальных микроскопических грибов в анаэробных условиях // Микология и фитопатология. 2007. Т. 41, вып. 6. С. 526–535.
- Кураков А.В., Пахненко О.А., Костина Н.В., Умаров М.М. Образование закиси азота микроскопическими грибами на питательных средах и в стерильной почве // Почвоведение. 1997. № 12. С. 1497–1503.
- Кураков А.В., Хидиров К.С., Садыкова В.С., Звягинцев Д.Г. Способность к анаэробному росту и активность спиртового брожения у микроскопических грибов // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 2. С. 169–173.
- Мэггаран Э. Экологическое разнообразие и его измерение. Пер. с англ. М.: Мир, 1992. 184 с.
- Пивкин М.В., Кузнецова Т.А., Сова В.В. Морские грибы и их метаболиты. Владивосток: Дальнаука, 2006. 286 с.
- СанПиН 1.2.3685–21. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания. Официальное издание. М.: Стандартинформ, 2021. 365 с.
- СанПиН 2.1.3684–21. Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещ. Официальное издание. М.: Стандартинформ, 2021. 75 с.
- Anaissie E.J., Stratton S.L., Dignani M.C., Lee C., Summerbell R.C., Rex J.H. Pathogenic molds (including *Aspergillus* species) in hospital water distribution systems: a 3-year prospective study and clinical implications for patients with hematologic malignancies // Blood. 2003. V. 101. P. 2542–2546.
- Arvanitidou M., Kanellou K., Constantinides T.C., Katsouyannopoulos V. The occurrence of fungi in hospital and community potable waters // Letters in Applied Microbiology. 1999. V. 29. P. 81–84.
- Babič M., Zalar P., Ženko B., Džeroski S., Gunde-Cimerman N. Yeasts and yeast-like fungi in tap water and groundwater, and their transmission to household appliances // Fungal Ecol. 2016. V. 20. P. 30–39.
- Babič M.N., Gunde-Cimerman N., Vargha M., Tischner Z., Magyar D., Veríssimo C., Sabino R., Viegas C., Meyer W., Brandão J. Fungal Contaminants in Drinking Water Regulation? A Tale of Ecology, Exposure, Purification and Clinical Relevance // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2017. V. 14. № 6. P. 636.
- Crous P.W., Braun U., Schubert K., Groenewald J.Z. The genus *Cladosporium* and similar dematiaceous hyphomycetes // Stud. Mycol. 2007. V. 58. P. 1–253.
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H. Compendium of Soil Fungi, 2nd ed. Eching: IHW-Verlag, 2007. 672 p.
- Ekendahl S., O'Neill A.H., Thomsson E., Pedersen K. Characterisation of Yeasts Isolated from Deep Igneous Rock Aquifers of the Fennoscandian Shield // Microbial Ecology. 2003. V. 46. № 4. P. 416–428.
- Frankova E., Horecka M. Filamentous soil fungi and unidentified bacteria in drinking water from wells and water mains near Bratislava // Microbiol. Res. 1995. V. 150. P. 311–313. 7
- Gessner M., van Ryckegem G. Water Fungi as Decomposers in Freshwater Ecosystems. In Encyclopedia of Environmental Microbiology. Bitton G. (Ed.). New York: Wiley, 2003. P. 1–38.
- Gleason F., Schmidt K., Marano V. Can zoosporic true fungi grow or survive in extreme or stressful environments? // Extremophiles. 2010. V. 14. P. 417–425.
- Gonçalves A.B., Paterson R.R.M., Lima N. Survey and significance of filamentous fungi from tap water // Int. J. Hyg. Environ. Health. 2006. V. 209. P. 257–264.
- Göttlich E., van der Lubbe W., Lange B., Fiedler S., Melchert I., Reifenrath M., Flemming H.-C., de Hoog S. Fungal flora in groundwater-derived public drinking water // International Journal of Hygiene and Environmental Health. 2002. V. 200. P. 269–279. 11
- Hageskal G., Gaustad P., Heier B.T., Skaar I. Occurrence of moulds in drinking water // Journal of Applied Microbiology. 2007. V. 102. P. 774–780.
- Hayette M.-P., Christiaens G., Mutsers J., Barbier C., Huyenen P., Meli P., de Mol P. Filamentous fungi recovered from the water distribution system of a Belgian university hospital // Med. Mycol. 2010. V. 48. P. 969–974.
- Jones E.B.G., Hyde K.D., Pang K.L. Freshwater Fungi and Fungal-like Organisms. Berlin; Boston: Walter de Gruyter GmbH, 2014. 496 p.
- Klich M.A. Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116 p.
- Krauss G.-J., Solé M., Krauss G., Schlosser D., Wesenberg D., Bärlocher F. Fungi in freshwaters: Ecology, physiology and biochemical potential // FEMS Microbiol. Rev. 2011. V. 35. P. 620–651.
- Miettinen H., Kietäväinen R., Sohlberg E., Numminen M., Ahonen L., Itävaara M. Microbiome composition and geochemical characteristics of deep subsurface high-pressure environment, Pyhäsalmi mine Finland // Front. Microbiol. 2015. V. 6. № 1203. P. 1–16.
- NFA. Livsmedelsverkets Föreskrifter om Dricksvatten, SLVFS 2001:30, 1st ed. Uppsala, Sweden: National Food Administration, 2001. P. 33.

- Oliveira B.R., Crespo M.T., San Romão M.V., Benoliel M.J., Samson R.A., Pereira V.J. New insights concerning the occurrence of fungi in water sources and their potential pathogenicity // *Water Res.* 2013. V. 47. P. 6338–6347.
- Pereira V.J., Fernandes D., Carvalho G., Benoliel M.J., San Romão M.V., Barreto Crespo M.T. Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods // *Water Res.* 2010. V. 44. P. 4850–4859.
- Raper K.B., Fennell D.I. The Genus *Aspergillus*. Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1965. 686 p.
- Raper K.B., Thom C., Fennell D.I. A Manual of the *Penicillia*. New York–London: Hafner Publishing Company, 1968. 875 p.
- Rifai M.A. A revision on the genus *Trichoderma* // *Mycol. Pap.* 1969. V. 116. P. 1–56.
- Sammon N.B., Harrower K.M. Microfungal Contamination of Municipal Water Supplies – A Review // *Water*. 2008. V. 35. P. 98–102.
- Sammon N.B., Harrower K.M., Fabbro L.D., Rob H. Reed Three Potential Sources of Microfungi in a Treated Municipal Water Supply System in Sub-Tropical Australia // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2011. V. 8. P. 713–732.
- Samson R.A., Houbbraken J. Phylogenetic and taxonomic studies on the genera *Penicillium* and *Talaromyces* // *Stud. Mycol.* 2011. V. 70. P. 1–183.
- Schipper M.A. On certain species of *Mucor* with a key to all accepted species: 2. On the genera *Rhizomucor* and *Parasitella* // *Stud. Mycol.* 1978. V. 17. P. 1–71.
- Seifert K., Morgan-Jones G., Gams W., Kendrick B. The genera of hyphomycetes. CBS Biodiversity Series 9. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2011. 997p.
- Shoun H., Kim D.H., Uchiyama H., Sugiyama J. Denitrification by fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 1992. Vol. 92. P. 277–282.
- Sohlberg E., Bomberg M., Miettinen H., Nyyssönen M., Salavirta H., Vikman M., Itävaara M. Revealing the unexplored fungal communities in deep groundwater of crystalline bedrock fracture zones in Olkiluoto, Finland // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. № 573. P. 1–11.
- Wurzbacher C., Kerr J., Grossart H.-P. Aquatic fungi. In *The Dynamical Processes of Biodiversity: Case Studies of Evolution and Spatial Distribution*, 1st ed. Grillo O., Venora G. (Eds). Rijeka: InTech, 2011. V. 1. P. 227–258.
- Wurzbacher C., Kreiling A.-K., Svantesson S., den Wyngaert S., Larsson E., Heeger F., Nilsson H., Pálsson S. Fungal communities in groundwater springs along the volcanic zone of Iceland // *Inland Waters*. 2020. V. 10. № 3. P. 418–427.
- Yamaguchi M.U., Rampazzo R.C.P., Yamada-Ogatta S.F., Nakamura C.V., Ueda-Nakamura T., Filho B.P.D. Yeasts and filamentous fungi in bottled mineral water and tap water from municipal supplies // *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2007. V. 50. P. 1–9.

Fungi in Groundwater Springs and Wells in the Moscow Region

Kurakov A. V.^{1, #}, Shumakova A. A.¹, Fedorova M. D.¹

¹Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, st. Kolmogorova, 1 building 12, Moscow, 119234 Russia

#e-mail: kurakov57@mail.ru

The number, species composition and taxonomic structure of fungal biota in the groundwater of natural springs and wells in the Moscow region were determined by cultural method. The number of fungi was low, on average from 10 to 300 colony-forming units (CFU) in 1 liter of water. 6–16 species were isolated from the water of one source or well, and totally 46 species were isolated from 6 studied objects. These were representatives of phylum Mucoromycota class Mucoromycetes (*Absidia cylindrospora* var. *nigra*, *Mucor circinelloides*, *M. hiemalis*, *Rhizopus stolonifer*), phylum Ascomycota class Eurotiomycetes (15 species of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*), Sordariomycetes (13 species of the genera *Acremonium*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Plectosphaerella*, *Trichoderma*), Dothideomycetes (*Alternaria alternata*, *A. nobilis*, *Amorocoelephoma cassia*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum*) and – Saccharomycetes (*Candida solani*, *C. zeylanoides*, *Galactomyces pseudocandidus*) and phylum Basidiomycota class Tremellomycetes (*Mrakia gelida*, *Vishniacozyma victoriae*) and Agaricomycetes (*Phlebia acerina*, *Psathyrella candolleana*, *Thanatephorus cucumeris*). The established taxonomic structure of fungal biota in the waters of natural springs and wells of the Moscow metropolis is similar to that found in the groundwater of other regions, including of groundwater at the depths of several hundred meters. The possibilities of adaptation of micromycetes to existence in ground water, the sources of its contamination and the need for mycological criteria for assessing water quality are discussed.

Keywords: fungi, species diversity, taxonomic structure, ground water, freshwater springs, wells, mycological criterion

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ МЕТАБИОТИКОВ ШТАММОВ РОДА *ENTEROCOCCUS* НА РОСТ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ПНЕВМОНИЮ

© 2024 г. А. Исраелян*, @, Ц. Балабекян**, З. Саргсян***, Ф. Тхруни**

*Государственная некоммерческая организация “Арцахский научный центр”,
Тигран Мец, 26, Степанакерт, 2600 Нагорно-Карабахская Республика,

**Научно-производственный центр Армбиотехнологии НПП Национальной академии наук,
Гюрджян, 14, Ереван, 0056 Республика Армения

***Центр эпидемиологии и гигиены, Ар. Аракелян, 14, Степанакерт, 2600 Нагорно-Карабахская Республика

@E-mail: arevik_israelyan@mail.ru

Поступила в редакцию 23.11.2022 г.

После доработки 07.03.2023 г.

Принята к публикации 12.07.2023 г.

Наибольшая антимикробная активность (100%) в отношении штаммов *Klebsiella pneumoniae* и *Streptococcus pneumoniae*, вызывающих пневмонию, показана при использовании белоксодержащих фракций (АМП), полученных после очистки культуральной жидкости (КЖ) при культивировании молочнокислых бактерий (МКБ) рода *Enterococcus*, выделенных из кисломолочных продуктов коз и ослиц, а наименьшая активность АМП — из КЖ штаммов, выделенных из кисломолочных продуктов коров (20–50%). Также выделены полисахариды штаммов рода *Enterococcus*, состоящие из молекул глюкозы и галактозы, обладающие антимикробной активностью. Разница в эффективности воздействия полисахаридов, выделенных из КЖ исследованных штаммов, зависит от концентрации полисахарида, источника выделения возбудителя, родовой и видовой принадлежности штамма, вызывающего пневмонию. Сделан вывод о перспективности использования некоторых метабитиков МКБ рода *Enterococcus* (пептидов и полисахаридов) в качестве биоингибиторов роста патогенных бактерий.

Ключевые слова: пневмония, антибиотики, полисахариды, антимикробные препараты

DOI: 10.31857/S1026347024010061, **EDN:** LSFEDO

В последние годы резистентность патогенных бактерий желудочно-кишечного тракта к антибиотикам рассматривается как серьезная проблема в связи с широким использованием традиционных антибиотиков при лечении заболеваний человека и животных.

Исследования последних лет по поиску новых антибиотиков привели к одной из самых многообещающих новых концепций — использованию метабитиков (пептидов, полисахаридов) в качестве антимикробных агентов. Противомикробные препараты, которые представляют собой встречающиеся в природе пептиды (белковоподобные вещества), обладают бактерицидным (убийцы клеток) или бактериостатическим (ингибиторы роста бактерий) действием. Различные исследователи показали, что молочнокислые бактерии (МКБ) обладают большим потенциалом для синтеза экзополисахаридов (ЭПС). ЭПС, производимые МКБ, привлекают все больше внимания,

главным образом из-за их преимуществ для здоровья, таких как иммунная стимуляция, антимутагенность, повышенное содержание антиоксидантов и противоопухолевая активность. Некоторые из них способствуют селективному росту молочнокислых бактерий и бифидобактерий, тем самым играя роль в микробиоте и иммунной системе хозяина (Dertli *et al.*, 2016; Jurášková. *et al.*, 2022).

Показано, что штаммы молочнокислых бактерий, выделенные из молока различных домашних животных Республики Армения и Республики Арцах, имеют разную видовую и родовую принадлежность, а также разные физиологические, антибактериальные и пробиотические свойства (Bokulich *et al.*, 2015; Israelyan *et al.*, 2016). Проведенные исследования показали, что выделенные и изученные МКБ из южных районов Кавказа в основном представлены бактериями рода *Enterococcus* (Bokulich *et al.*, 2015).

Белоксодержащие фракции с антимикробной активностью (АМП) были получены методом гель-фильтрации супернатанта культуральной жидкости (КЖ) штаммов рода *Enterococcus*, выделенных из ферментированного молока. Исследования отдельных МКБ из ферментированного молока различных домашних животных (коров, овец, буйволиц, ослици и коз) показали, что пробиотические бактерии, выделенные из молока ослици, обладают высокой устойчивостью к антибиотикам (Israyelyan, 2018). Показано, что антимикробная активность штаммов рода *Enterococcus* обусловлена синтезом белковоподобных веществ и зависит от времени, температуры и состава питательной среды. Наибольшая антимикробная активность исследуемых штаммов проявляется при температуре выращивания 42 (Israyelyan *et al.*, 2015).

Целью данной работы явилось изучение выделенных штаммов МКБ рода *Enterococcus* с пробиотическими свойствами, синтезирующих разные метаболиты, на способность подавлять рост некоторых патогенных бактерий, вызывающих пневмонию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Микробные штаммы и питательные среды

В лаборатории технологии получения пробиотиков научно-производственного центра «Армбиотехнология» НАН РА из образцов молока ослици, отобранных в стерильных условиях из домашних хозяйств различных высокогорных районов Республики Армения и Арцаха, были выделены штаммы молочнокислых бактерий. Все штаммы депонированы в Центре микробного депозитария (МДЦ) ННЦ «Армбиотехнология» НАН. Штаммы МКБ выращивали на агаре и бульоне MRS Merck (Германия), ISO (Италия), HiMedia (Индия). Штаммы МКБ хранятся в замороженном виде при -20°C в бульоне MRS, содержащем 40% глицерина. Штаммы идентифицированы с помощью API-теста, секвенирования 16S рНК и RAPD PCR.

Приготовление инокулята и получение супернатанта культуральной жидкости

Единичные колонии выращивали в 5 мл бульона MRS (37, 48 ч), после чего переносили в колбу Эрленмейера на 100 мл, содержащую 50 мл бульона MRS, и инкубировали при 37 в течение 48 ч в термостате. По окончании роста культуры бульон центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 мин и полученный супернатант концентрировали в 5 раз. Антимикробные препараты получали из супернатанта культуральной жидкости после культивирования исследуемых штаммов методом ионообменной хроматографии (Aghajanyan *et al.*, 2015).

Определение антимикробной активности

Антимикробную активность полученных препаратов определяли согласно описанному методу (Parente *et al.*, 1995). Антибиотикорезистентность патогенных штаммов, выделенных от больных пациентов, определяли в Институте эпидемиологии, микробиологии и паразитологии МЗ РА и в Степанакертском центре гигиены и эпидемиологии. Для определения резистентности выделенных возбудителей к антибиотикам применяли метод со стандартными дисками антибиотиков (Oxoid, Великобритания) (Bauer *et al.*, 1966).

Выделение белковоподобных фракций с антимикробными свойствами супернатанта КЖ осуществляли методом гель-фильтрации. Для выделения полисахаридов был использован метод, описанный (Dertli *et al.*, 2016).

Статистический анализ

Использовались приложения Microsoft Office Excel 2010. Уровень статистической значимости был установлен на уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовали антимикробную активность АМП различных штаммов рода *Enterococcus* в отношении антибиотикорезистентных бактерий. На рис. 1 показана антимикробная активность белоксодержащих фракций после гель-фильтрации супернатанта КЖ штамма *Ent. faecium* KE-5 против *St. pneumoniae*.

Как видно из приведенных данных (табл. 1), эффективность ингибирования роста патогенных бактерий с помощью АМП разных штаммов *Enterococcus*, выделенных из ферментированного молока разных домашних животных, различается в зависимости от источника выделения МКБ. Наибольшая антимикробная активность (100%) в отношении штаммов *Klebsiella pneumoniae* возникает при использовании АМП, полученных из КЖ после выращивания штаммов *Enterococcus*, выделенных из ферментированного козьего молока и молока ослици, а наименьшая активность АМП — из КЖ ферментированного коровьего молока (20–50%).

При выращивании штаммов ($N = 19$), выделенных из ферментированного молока ослици, в питательной среде MRS были отобраны штаммы с антимикробной активностью и выделены полисахариды. Используемый метод ВЭЖХ показал, что выделенные полисахариды штаммов *Ent. faecium* KE-5, *Ent. durans* KE-6, *Ent. faecium* KE-9 с антимикробной активностью состоят из молекул глюкозы и галактозы. Следует отметить, что не все полисахариды обладали способностью подавлять рост патогенных бактерий.

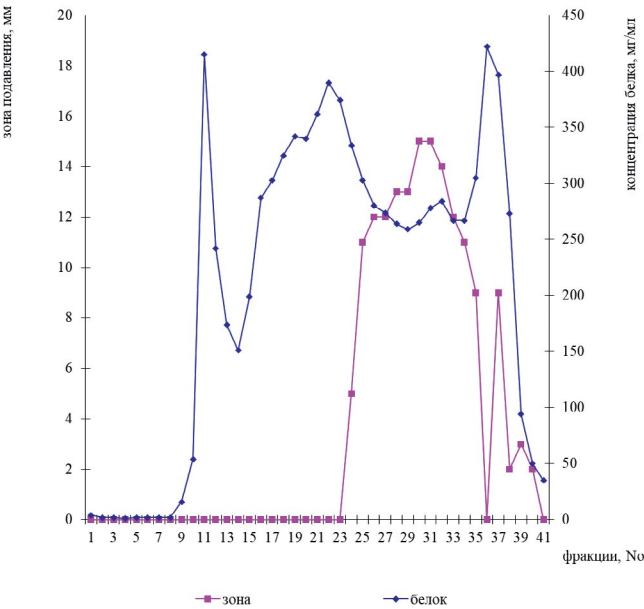


Рис. 1. Антимикробная активность белоксодержащих фракций, полученных после очистки супернатанта КЖ штамма *Ent. faecium* KE-5 методом гель-фильтрации против *St. pneumonia*.

Полисахарид, выделенный из концентрата КЖ после выращивания штамма *Ent. faecium* KE-5, обладал высокой антимикробной активностью в отличие от других исследованных полисахаридов. Следует отметить, что снижение концентрации водного раствора полисахарида ниже 10% приводило к снижению антимикробной активности.

На рис. 2 представлены результаты подавления роста патогенных штаммов, выделенных из инфицированного глаза, полученным полисахаридом из КЖ штамма *Ent. faecium* KE-5, путем нанесения 20 мкл его 10–20%-го водного раствора на поверхность исследуемых патогенных бактерий на чашках Петри.

Как видно из данных (рис. 2) 10%-й водный раствор полисахаридов штамма *Ent. faecium* KE-5 ингибировал рост только двух штаммов патогенных бактерий *Kl. pneumonia* f1 1231 и *St. pneumonia* f1 400. Антимикробный препарат (АМП) и супернатант КЖ, содержащий разные метаболиты (белковоподобные фракции, полисахариды и органические кислоты), с разной эффективностью подавляют рост двух патогенных штаммов.

Эффективность использования препаратов, содержащих полисахарид, можно сравнить с 12 антибиотиками, ингибирующими рост используемых патогенных бактерий (рис. 3). Как видно из приведенных данных, используемые антибиотики (метод дисков) также с разной эффективностью подавляли рост используемых штаммов патогенных бактерий, выделенных из инфицированного глаза.

На рис. 4 представлены результаты ингибирования роста патогенных штаммов — возбудителей пневмонии, выделенных из мокроты зева больного при использовании полисахаридов и АМП. Ингибирование роста бактерий *St. pneumonia* было более эффективным, чем роста бактерий *Kl. pneumonia*. Используемые полисахариды ингибировали рост патогенных бактерий с той же эффективностью, что и некоторые антибиотики (рис. 5).

Таблица 1. Сравнительная антимикробная активность АМП из различных штаммов рода *Enterococcus* против антибиотикорезистентных бактерий (%)

Устойчивые к антибиотикам штаммы	N	Источник выделения МКБ из молока разных домашних животных										антибиотики N = 13
		корова				коза		ослица	буйво- лица	овца		
		<i>Ent. faecium</i> M22	<i>Ent. durans</i> M42	<i>Ent. durans</i> M44	<i>Ent. durans</i> P13	<i>Ent. faecium</i> KAP-1	<i>Ent. faecium</i> KA 3	<i>Ent. faecium</i> AE 225-9	<i>Ent. durans</i> AG 76	<i>Ent. faecalis</i> AV 222	<i>Ent. faecium</i> KV 15-1	
<i>Staph. aureus</i>	28	0.0	0.0	0.0	25.0	50.0	50.0	0.0	50.0	50.0	0.0	75.0
<i>Ps. aeruginosa</i>	21	50.0	0.0	50.0	58.0	100.0	100.0	100.0	50.0	50.0	50.0	60.0
<i>Pr. mirabilis</i>	23	50.0	20.0	50.0	29.0	50.0	100.0	100.0	0.0	0.0	50.0	85.0
<i>Kl. pneumonia</i>	8	0.0	50.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	83.0
<i>Pr. vulgaris</i>	7	0.0	0.0	0.0	0.0	33.0	66.0	66.0	33.0	33.0	66.0	66.0
<i>E. coli</i>	15	50.0	40.0	50.0	15.0	100.0	100.0	33.0	33.0	33.0	33.0	55.0

Примечание. АМП – антимикробные препараты, полученные после гель-фильтрации КЖ.

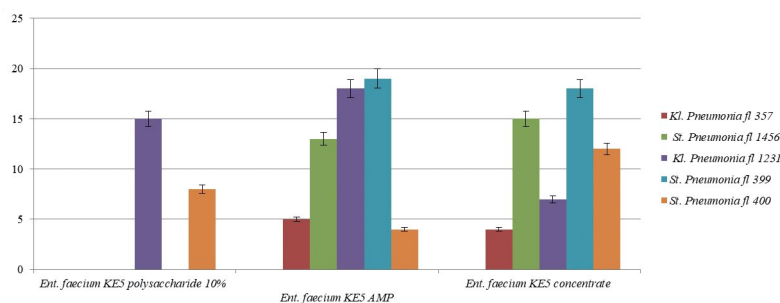


Рис. 2. Действие антимикробных препаратов в отношении штаммов, выделенных из инфицированных глаз, Ø мм.

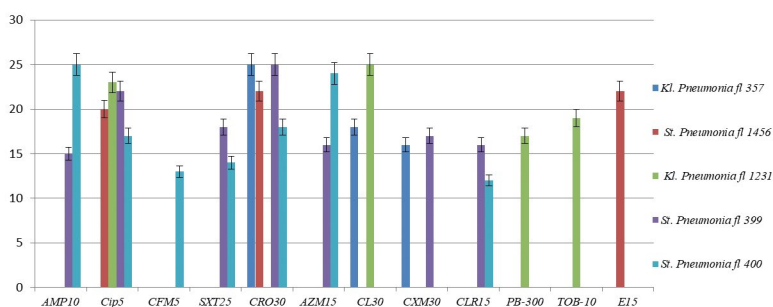


Рис. 3. Действие антибиотиков на штаммы, выделенные из инфицированных глаз, Ø мм.

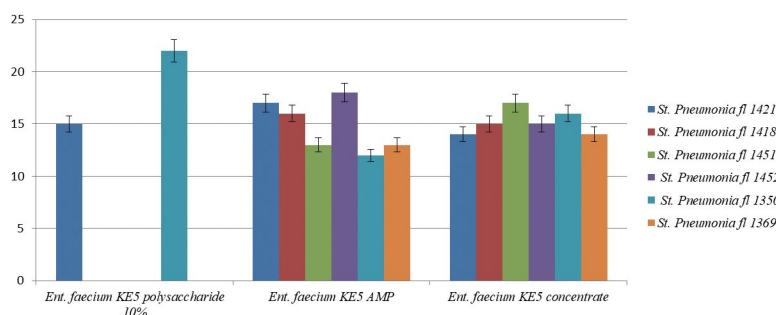


Рис. 4. Влияние противомикробных препаратов на рост бактерий, выделенных из зева, Ø мм.

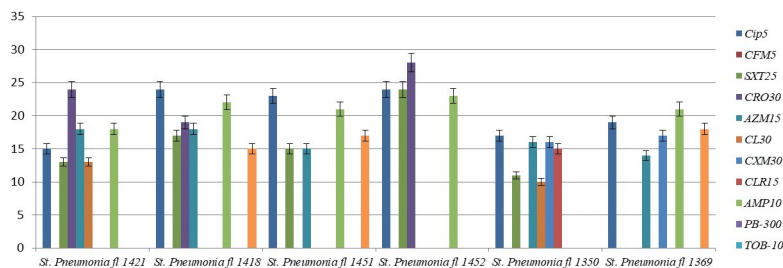


Рис. 5. Влияние антибиотиков на рост выделенных бактерий из зева, Ø мм.

Таблица 2. Сравнительная характеристика ингибирования роста штаммов *Kl. pneumonia* и *St. pneumonia*

Патогенные бактерии	N	Штамм	Полисахариды, %	%		
				У	П	Ч
<i>Kl. pneumonia</i>	9	Ent. faecium KE5	10	92.3	7.7	0
<i>St. pneumonia</i>	7	Ent. faecium KE5	20	68.4	10.5	21.1
<i>St. pneumonia</i>	5	Ent. sp. KE13	20	0	0	100
		Ent. sp. KE14	20	33.33	66.67	0

Примечание. У – устойчивый, П – промежуточный, Ч – чувствительный

Сравнительная характеристика ингибирования роста изученных патогенных штаммов *Kl. pneumonia* и *St. Pneumonia* приведена в табл. 2.

Как видно из приведенных данных, полисахариды (10%-й водный раствор), выделенные из КЖ разных штаммов, полученные из ферментированного молока ослиц, обладают разной антимикробной активностью против резистентных вариантов патогенных бактерий.

Таким образом, некоторые штаммы рода *Enterococcus* с пробиотическими свойствами, выделенные из молока ослиц, синтезируют белковоподобные вещества и полисахариды, состоящие из глюкозы и галактозы, и обладают разной антимикробной активностью в отношении исследуемых возбудителей пневмонии. Можно предположить, что высокая антимикробная активность штаммов может быть результатом суммарного действия продуктов метаболизма (полисахариды и белковоподобные вещества), образующихся при культивировании штамма *Ent. faecium* KE-5.

Ранее нами было показано, что очищенные пептиды из пробиотического штамма *Lactobacillus rhamnosus* BTK 2012 (BCN 1–1470 Da и BCN 2–670 Da) и *Lactobacillus acidophilus* 1991 (BCN-1100 Da) проявляют антимикробную активность в отношении грамотрицательных и грамположительных возбудителей, таких как *Salmonella sp.*, *Escherichi*

coli, *Proteus mirabilis*, *Pasteurella sp.*, *Clostridium sp.*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sp.*, а также ряда устойчивых к антибиотикам возбудителей. Эффективность различалась в зависимости от вида возбудителя, а также источника выделения (кровь, фекалии, моча и др.) (Tkhruni *et al.*, 2013, 2015). Влияние белка-бактериоцина (BCN 2–670 Da) КЖ *L. rhamnosus* BTK 2012 на рост полирезистентных патогенных бактерий, выделенных от инфицированных пациентов (различные источники, такие как кровь, фекалии, слюна и моча), представлено на рис. 6.

Сравнивая результаты действия полученных полисахаридов на рост бактерий *Klebsiella sp.*, видно, что разница в эффективности зависит от источника выделения возбудителей. Полученные данные согласуются с опубликованными данными ряда авторов (Yermolenko *et al.*, 2006; Karapetyan *et al.*, 2017). Различная эффективность ингибирования роста патогенных бактерий также может быть связана с различными механизмами действия веществ на клеточные мембраны разных патогенных бактерий.

ВЫВОДЫ

Таким образом, очевидна перспективность использования некоторых метаболитов (белковоподобных веществ, полисахаридов), полученных из пробиотического штамма рода *Enterococcus*

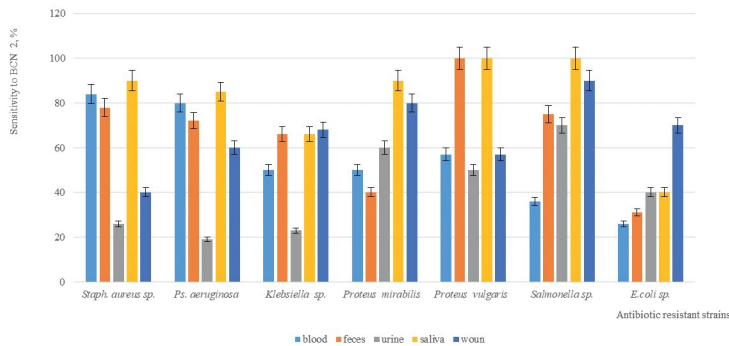


Рис. 6. Антимикробная активность BCN 2 (бактериоцин) в отношении некоторых патогенных бактерий человека.

против некоторых патогенных штаммов-возбудителей пневмонии. Эти метабитики могут использоваться для длительного применения против устойчивых к антибиотикам патогенов различной этиологии для профилактики или лечения инфекционных заболеваний. Работы в данном направлении продолжаются.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке исследовательского гранта Государственного комитета науки РА по проекту “23Т/АА-002”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aghajanyan A.E., Tkhruni F.N., Hovhannisyan G.S., Eghyan K., Vardanyan A.A., Saghyan A.S. A method of producing and purification of bioinhibitors from culture liquids. Patent RA № 2925 A, 27.04. 2015.
- Bauer A.W., Kirby M.M., Sherris J.C., Turk M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method // *Am.J. Clin. Pathol.* 1966. V. 45. P. 493–496.
- Bokulich N., Amiranashvili L., Chitchyan K., Ghazanchyan N., Darbinyan K., Gagelidze N., Sadunishvili T., Goginyan V., Kvesitadze G., Torok T., Mills D. Microbial biogeography of the transnational fermented milk matsoni // *Food Microbiology*. 2015. P. 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.018>
- Dertli E., Mercan E., Arici M., Yilmaz M.T., Sagdic O. Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics // *LWT-Food Science and Technology*. 2016. V. 71. P. 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.030>
- Israyelyan A., Karapetyan K., Tkhruni F., Arstamyany L., Balabekyan T. Sensitivity of different pathogens to biological antimicrobial agents // *European Journal of Biomedical and Life Sciences*. 2015. V. 3. P. 61–66.
- Israyelyan A.L., Tkhruni F.N., Arstamyany L.A., Balabekyan T.R., Khachatryan T.V., Karapetyan K.J. Comparative characterization of endemic lactic acid bacteria isolated from several regions of Armenia and Nagorno Karabakh Republics // *Biolog. Journ. of Armenia, NAS RA*. 2016. P. 50–57.
- Israyelyan A.L. Investigation of lactic acid bacteria and their metabiotics isolated from milk of different domestic animals of Artsakh. Dis. Ph D. Yerevan, 2018. P. 116.
- Jurášková D., Ribeiro S., Silva C. Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria: From Biosynthesis to Health-Promoting Properties. *Foods*. 2022. V. 11. P. 156. <https://doi.org/10.3390/foods11020156>
- Karapetyan K., Tkhruni F., Israyelyan A., Yermolenko E., Verdyan A. Comparative characterization of endemic lactic acid bacteria of Enterococcus genus // *International Science of technology*. 2017. V. 6. P. 357–365.
- Parente E., Brienza C., Moles M., Riccardi A. A comparison of methods for measurement of bactriocin activity // *Journal of Microbiology Methods*. 1995. Vol. 22. P. 95–108.
- Tkhruni F., Karapetyan K., Danova S., Dimova S., Karimpur F. Probiotic properties of endemic strains of lactic acid bacteria // *J. BioSci. Biotech.* 2013. V. 2. P. 1–6.
- Tkhruni F., Balabekyan Ts., Karapetyan K., Yakimovich N., Arstamyany L. Antibacterial activity of single cells in the population of lactic acid bacteria // *European Journal of Biomedical and Life Sciences*. 2015. V. 3. P. 76–80.
- Yermolenko E., Chernish A., Aleshina G. Antagonistic activity of *Enterococcus faecium* L3 against different groups of pathogenic streptococci. *Streptococci New Insights Into and Old Enemy*. 2006. May. P. 363–366. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2005.11.030>

Effect of Some Metabiotics from Strains of the Genus Enterococcus on the Growth of Pathogenic Bacteria that Cause Pneumonia

A. Israyelyan^{1, #}, Ts. Balabekyan², Z. Sargsyan³, F. Tkhruni²

¹Artsakh Scientific Center State Non-Commercial Organization, Tigran Mets 26, Stepanakert, 2600 Nagorno Karabakh Republic

²Scientific and Production Center Armibiotechnology NSPO, National Academy of Science, Gyurjyan 14, Yerevan, 0056 Republic of Armenia,

³Center for Epidemiology and Hygiene, Ar. Arakelyan 14, Stepanakert, 2600 Nagorno Karabakh Republic

#e-mail: arevik_israelyan@mail.ru

It is shown that the highest antimicrobial activity (100%) against strains of *Kl. pneumonia* and *St. pneumonia* of strains causing pneumonia occurs when using protein-like fractions (AMP) obtained

from CL after cultivation of LAB of strains of the genus *Enterococcus* isolated from fermented milk of goats and donkeys, and the lowest activity of AMP from CL of strains isolated from fermented milk of cows (20–50%). It was shown that the isolated polysaccharides of strains of the genus *Enterococcus*, which have antimicrobial activity, consist of glucose and galactose molecules. The difference in the effectiveness of the influence of polysaccharides depends on the source of the isolated pathogens, depends on the concentration of the polysaccharide, the genus and species of the strain causing pneumonia. It is concluded that some metabiotics of the *Enterococcus* genus are promising for use as bioinhibitors of the growth of pathogenic bacteria.

Keywords: pneumonia, antibiotics, polysaccharides, antimicrobials.

АНАЛИЗ ПАРАЗИТОФАУНЫ И ЭНДОСИМБИОНТОВ *LISSOTRITON VULGARIS* L., 1758 (CAUDATA, SALAMANDRIDAE) В ПРИРОДНЫХ И УРБАНИСТИЧЕСКИХ ГРАДИЕНТАХ СРЕДЫ

© 2024 г. А. В. Буракова*, @, Д. Л. Берзин*, В. Л. Вершинин*, **

*Институт экологии растений и животных УрО РАН, ул. 8 Марта, 202, Екатеринбург, 620144 Россия

**Уральский федеральный университет им. Б. Н. Ельцина, ул. Мира, 19, Екатеринбург, 620002 Россия

@E-mail: annabios@list.ru

Поступила в редакцию 16.11.2022 г.

После доработки 01.02.2023 г.

Принята к публикации 06.02.2023 г.

Впервые представлен анализ паразито- и эндосимбионтофауны обыкновенного тритона (*Lissotriton vulgaris* L., 1758) в природных и урбанистических ландшафтах Среднего Урала. Обнаружено 4 вида гельминтов, относящихся к типу Nematoda, в том числе 1 таксон не определенный до вида (*Nematoda* sp.), и 1 вид эндосимбионтов (тип Chromista). Проанализированы работы, посвященные видовому составу паразитов *L. vulgaris* на территории Евразии. Фауна гельминтов обыкновенного тритона на восточном склоне Урала обеднена, что, вероятно, определяется лимитированным распространением вида за пределами Европы, температурным режимом на севере и влагообеспеченностью на юге.

Ключевые слова: обыкновенный тритон, гельминты, урбоценоз, природный градиент среды

DOI: 10.31857/S1026347024010072, **EDN:** LRALIN

Обыкновенный тритон (*Lissotriton vulgaris* L., 1758) – широко распространенный и экологически пластичный вид хвостатых земноводных (Вершинин, 2007), населяющий лесную зону европейской части и уступающий по численности только бурым лягушкам. Данный вид встречается в антропогенных ландшафтах (главным образом в лесопарковой и пригородной зонах) (Вершинин, 2007; Кузьмин, 2012). Угроза исчезновения локальных популяций *L. vulgaris* относительно меньше в сравнении с *Triturus cristatus* (Laurenti, 1768) (Kinne, 2006). Однако в ландшафтах мегаполисов *L. vulgaris* может иметь статус редкого и даже исчезающего вида (Файзулин, Кузовенко, 2015; Кидов и др., 2021).

Численность и распространение многих видов земноводных в последние десятилетия глобально сокращается по различным причинам: химическое загрязнение, разрушение и трансформация местобитаний, различные инфекции, появление инвазивных видов рыб и амфибий (Berger *et al.*, 1998; Houlahan *et al.*, 2000; Решетников, 2001; Blaustein, Kiesecker, 2002; Kinne, 2006; Wake, Vredenburg, 2008).

Одним из существенных биотических факторов, регулирующих численность хозяев, а значит, влияющих на выживаемость животных, являются паразитарные инвазии. Амфибии могут быть биологическими накопителями паразитов

и распространителями гельминтозов в природных экосистемах и служить дефинитивными, промежуточными, факультативными и резервуарными хозяевами для гельминтов. Некоторые виды трематод могут ускорять половое созревание у тритонов, вызывать сокращение продолжительности жизни (Sinsch *et al.*, 2018a), различные аномалии (Sessions, Ruth, 1990), делая их наиболее уязвимыми для хищников (Caffara *et al.*, 2014), и тем самым снижать выживаемость амфибий и приводить к сокращению популяции.

В пределах России паразитофауна *L. vulgaris* описана для Вологодской области (Шабунин, Радченко, 2012) и Республики Мордовия (Ручин, Чихляев, 2016). Наиболее полно гельминтофауна *L. vulgaris* изучена на территории Самарской области (Чихляев, 2007; Чихляев и др., 2018).

Для Уральского региона сведения по паразитам *L. vulgaris* отсутствуют. В связи с этим цель работы – сравнительный анализ паразитофауны *L. vulgaris* в европейской части ареала, природных и урбанистических ландшафтах Среднего Урала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось в мае 2020, 2021 годах на природных и урбанизированных территориях

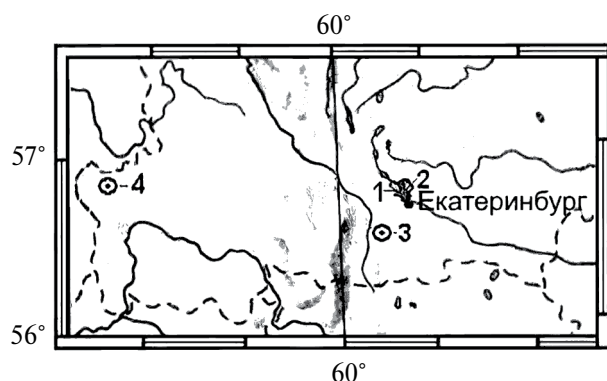


Рис. 1. Карта-схема сбора материала: 1 — селитебная часть города Екатеринбурга; 2 — лесопарковая часть города Екатеринбурга; 3 — с. Мраморское; 4 — д. Большое Кошаево.

Среднего Урала (рис. 1). Изучение паразитофауны в градиенте урбанизации проводили на примере г. Екатеринбурга, расположенного на восточном склоне Среднего Урала.

В пределах городской агломерации выделяли селитебную часть и лесопарковую зоны (Verzhinin *et al.*, 2015). В качестве контроля использовали загородные популяции *L. vulgaris* (рис. 1).

Изучена 191 особь обыкновенного тритона, из них 119 экз. в пределах городской агломерации (селитебная зона — 34 экз., лесопарковая зона — 85), природных — 72 экз.

Идентификацию паразитов проводили по стандартной методике (Ивашкин и др., 1971; Рыжиков и др., 1980). Зараженность амфибий оценена по следующим показателям: *P* (экстенсивность инвазии) — доля зараженных особей хозяина в исследованной выборке, (%); *A* (индекс обилия) — средняя численность паразитов определенного вида или группы паразитов у всех особей хозяина, экз./особь хозяина (Бреев, 1976). Оценка структуры доминирования проводилась с использованием подхода А. А. Кириллова (Кириллов, 2011). Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Quantitative Parasitology (Rozsa *et al.*, 2000) и Statistica 7.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В кишечнике исследованных обыкновенных тритонов было обнаружено 4 вида нематод (1 таксон не идентифицирован до вида) и 1 вид эндосимбиотических простейших. Видовой состав и показатели зараженности представлены в табл. 1, 2.

На природных территориях у *L. vulgaris* нематоды представлены 3 видами отряда Rhabditida, также отмечены неопределенные до вида экземпляры

(*Nematoda* sp.). В урбоценозах у *L. vulgaris* выявлено 2 вида нематод (табл. 1). Наряду с наличием общих видов (*Oswaldocruzia filiformis* и *Megalobatrachonema terdentatum*) на изученных территориях Среднего Урала для *L. vulgaris* только на восточном склоне отмечена личинка нематоды *Neoxysomatium brevicaudatum*, а на западном склоне обнаружены экземпляры *Nematoda* sp. Эндосимбиотические простейшие *Cepedea dimidiata* выявлены у *L. vulgaris* восточного склона Среднего Урала и в урбоценозах.

В среднеуральских популяциях *L. vulgaris* восточного склона, по доле в компонентном сообществе, доминирующим видом является *M. terdentatum* (97%) в сравнении с западным склоном (25%) (рис. 2).

В природных популяциях *L. vulgaris* западного склона отмечена бидоминантная структура — *O. filiformis* (40%) и *Nematoda* sp. (35%) (рис. 2). Экстенсивность инвазии для *M. terdentatum* также значимо выше у амфибий на восточном склоне в сравнении с западным склоном (табл. 1).

Для амфибий городской агломерации (селитебная и лесопарковая зоны) и природных территорий отмечено два общих вида паразитов — *O. filiformis* и *M. terdentatum* (табл. 2). На территории урбоценоза и на природных территориях восточного склона доминирует *M. terdentatum*, ее доля в градиенте урбанизации держится на высоком уровне (от 96.67% у амфибий загородных территорий до 97.44% у животных селитебной зоны). Доля *O. filiformis* низка и в градиенте урбанизации увеличивается (от 1.67% на загородной территории до 2.56% на селитебной) (рис. 3).

Личинка нематоды *N. brevicaudatum* отмечена у животных в природных популяциях, доля составляет 1.67% (табл. 2, рис. 3).

Эндосимбиотические простейшие отмечены как на селитебной территории, так и в природных ландшафтах. Экстенсивность инвазии для *C. dimidiata* значимо выше у *L. vulgaris* в селитебной зоне в сравнении с лесопарковой зоной и природной территорией (табл. 2).

Анализ литературных данных относительно фауны паразитов обыкновенного тритона на территории Евразии показал, что наиболее разнообразной по видовому составу гельминтов является Республика Беларусь (8 видов, в их числе 5 видов трематод и 3 вида нематод) и Самарская область (8 видов, в их числе 6 видов трематод и 2 вида нематод). Меньше всего видов гельминтов отмечено в популяциях с территории Италии (Сесто-Фьорентино, регион Тоскана), Северной Греции и Республики Мордовия (1 вид). Причем в первых двух европейских регионах выявлены трематоды, у тритонов на территории Республики Мордовия отмечена нематода (табл. 3).

Таблица 1. Видовой состав и показатели заселенности паразитами и эндосимбионтами *L. vulgaris* в экосистемах Среднего Урала

Паразит/Эндосимбионт	$P \pm SE / A \pm SE$		
	Средний Урал (n = 191)		
	Природные территории (n = 72)		Урбоценоз (n = 119)
	Западный склон (n = 37)	Восточный склон (n = 35)	
Тип Nematoda Cobb, 1932			
Класс Chromadorea Inglis, 1983	24.30 ± 7.05	40.0 ± 8.28	29.40 ± 4.18
	0.54 ± 0.21	1.71 ± 0.60	1.04 ± 0.23
Отряд Rhabditida Chitwood, 1933 <i>Oswaldocruzia filiformis</i> (Goeze, 1782)	8.10 ± 4.46	2.90 ± 2.84	1.70 ± 1.19
	0.22 ± 0.16	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.02
<i>Megalobatrachonema terdentatum</i> (Linstow, 1890)	5.40 ± 3.72	34.3 ^a ± 8.03	28.60 ± 4.14
	0.14 ± 0.11	1.66 ± 0.60	1.02 ± 0.21
<i>Neoxysomatium brevicaudatum</i> , larvae Zeder, 1800	–	2.90 ± 2.84	–
		0.03 ± 0.02	
Nematoda sp.	24.30 ± 7.05	–	–
	0.19 ± 0.09		
Тип Chromista Cavalier-Smith, 1987			
Класс Opalineae Wenyon, 1926 <i>Cepedea dimidiata</i> (Metcalf, 1923)	–	17.10 ± 6.36	31.1 ± 4.24
		9.06 ± 4.37	17.33 ± 2.93
Всего видов	3/0	3/1	2/1

Примечание. Над чертой – P , экстенсивность инвазии, %; под чертой – A , индекс обилия, экз/особь хозяина; SE – математическая ошибка; в графе «Всего видов» через дробь указано число видов паразитов и эндосимбионтов; ^a – значительно выше в сравнении с западным склоном ($p < 0.05$); “–” – нет данных.

Таблица 2. Заселенность паразитами и эндосимбионтами *L. vulgaris* в градиенте урбанизации

Паразит/Эндосимбионт	$P \pm SE / A \pm SE$		
	Селитебная территория (n = 34)	Лесопарковая зона (n = 85)	Природные территории (n = 72)
Тип Nematoda Cobb, 1932			
Класс Chromadorea Inglis, 1983	26.50 ± 7.57 1.15 ± 0.42	31.80 ± 5.05 1.40 ± 0.26	42.90 ± 5.83 1.89 ± 0.59
<i>Oswaldocruzia filiformis</i> (Goeze, 1782)	5.30 ± 3.84 0.05 ± 0.03	2.50 ± 1.69 0.05 ± 0.03	2.90 ± 1.98 0.03 ± 0.02
<i>Megalobatrachonema terdentatum</i> (Linstow, 1890)	23.50 ± 7.27 1.12 ± 0.42	31.80 ± 5.05 0.98 ± 0.25	34.30 ± 5.59 1.66 ± 0.60
<i>Neoxysomatium brevicaudatum</i> , larvae Zeder, 1800	–	–	2.90 ± 1.98 0.03 ± 0.02
Тип Chromista Cavalier-Smith, 1987			
Класс Opalineae Wenyon, 1926 <i>Cepedea dimidiata</i> (Stein, 1860) (Metcalf, 1923)	$47.10^{ab} \pm 8.56$ 18.82 ± 4.99	24.70 ± 4.68 16.73 ± 3.59	17.10 ± 4.43 9.06 ± 4.37

Примечание. Над чертой – P , экстенсивность инвазии, %; под чертой – A , индекс обилия, экз/особь хозяина; SE – математическая ошибка; ^a – значительно выше в сравнении с лесопарковой зоной ($p < 0.05$); ^b – значительно выше в сравнении с природной территорией ($p < 0.05$); “–” – нет данных.

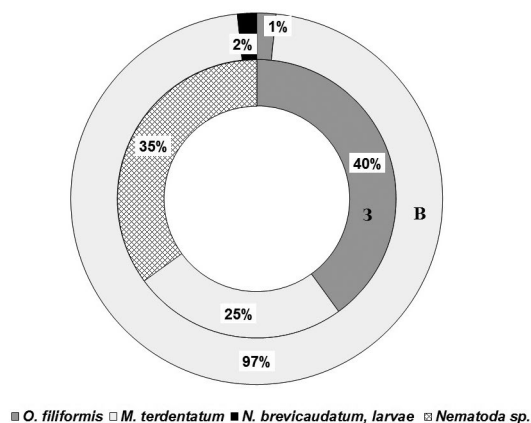


Рис. 2. Соотношение видов паразитов у *L. vulgaris* на западном и восточном склонах Среднего Урала (3 – западный склон; В – восточный склон).

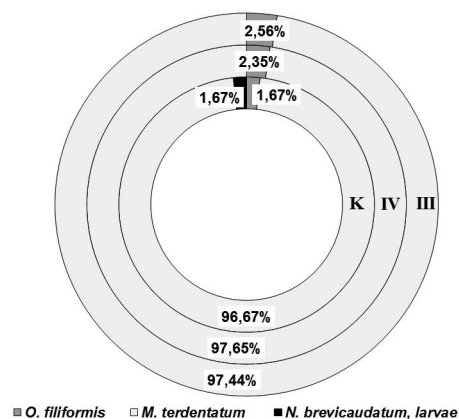


Рис. 3. Соотношение видов паразитов для *L. vulgaris* урбанизированных и природных территорий восточного склона Среднего Урала: III – селитебная территория города Екатеринбурга; IV – лесопарковая зона города Екатеринбурга; К – природные территории.

Для большинства рассмотренных регионов Европы и РФ наиболее часто встречаются две нематоды: *O. filiformis*, отмечена у *L. vulgaris* в Европе в юго-западной части Германии (Рейнланд-Пфальц), Северной Греции, в Республике Беларусь и в регионах РФ (Вологодская и Самарская области, Республика Мордовия), нематода *M. terdentatum* выявлена у *L. vulgaris* на территории Германии, в юго-западной части Англии (графство Сомерсет) и в Вологодской и Самарской областях.

Ряд видов известен только для определенных территорий: личиночные формы трематод *Paralepoderma cloacicola* (Luhe, 1909), met., *Pharyngostomum cordatum* (Diesing 1850), met., *Strigea* sp., met., отмечены у *L. vulgaris* с территории Самарской области; трематоды *Strigea sphaerula* (Rudolphi, 1803) Szidat, 1928 и *Opisthioglyphe ranae* (Frohlich, 1791), нематоды *Cosmocerca ornata* (Dujardin, 1845) Diesing, 1861 и *Agamospirura* Henry, Sisoff 1913 sp., larvae, обнаружены для обыкновенных тритонов с территории Республики Беларусь. Трематода *Clinostomum spp* Leidy, 1856 выявлена у *L. vulgaris*, обитающих в Италии (регион Тоскана); трематода *Parastrigea robusta* Szidat, 1928 и нематода *Cosmocerca longicauda* (Linstow, 1885) – у обыкновенного тритона с территории Германии. Скребень *Acanthocephalus anthuris* (Dujardin, 1845) обнаружен у *L. vulgaris*, населяющих юго-западную часть Англии (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Паразитофауна обыкновенных тритонов исследуемых территорий характеризуется как широко распространенными видами, так и специализированными гельминтами хвостатых земноводных.

Нематода *M. terdentatum* – европейский вид, узкоспецифичный паразит, характерный для обыкновенного тритона западных районов Украины, Беларуси и Чехословакии, отмечен у *L. vulgaris* на территории Вологодской области (Шабун, Радченко, 2012) и Поволжья (г. Самара) (Кириллов и др., 2018). Заражение *M. terdentatum* происходит перорально в воде или же через резервуарных хозяев (Petter, Chabaud, 1971). Существует мнение, что присутствие некоторых видов нематод может быть связано с обособленностью экологической ниши хвостатых, что оказало влияние на независимое формирование гельминтофауны этой группы хозяев в ходе эволюции (Рыжиков и др., 1980).

По данным А. А. Кириллова с соавторами (Кириллов и др., 2018), нематода *M. terdentatum* у обыкновенного тритона, обитающего на территории г. Самары, отмечена впервые. Зараженность животных данным видом также была низка и составила 25% и 0.5 экз. гельминтов на особь. Аналогичные данные показаны для *L. vulgaris* с территории Вологодской области (зараженность составляет 2 экз. у 1 особи) (Шабун, Радченко, 2012).

Доминирование *M. terdentatum* у обыкновенных тритонов на Восточном склоне Среднего Урала в природных экосистемах и урбоценозах, вероятно, связано со спецификой экологии самого хозяина (*L. vulgaris*), а также биологией данного гельминта. Заражение *M. terdentatum* происходит перорально в водную фазу жизни обыкновенного тритона в ходе активного питания при поедании резервуарных хозяев – гастропод и олигохет (Petter, Chabaud, 1971). Установлено (Petter, Chabaud, 1971), что третья инвазионная стадия *M. terdentatum* развивается в водной среде при температуре около 20°C. Показано (Берзин, Буракова, 2022), что заражение

Таблица 3. Видовой состав паразитов *L. vulgaris* по литературным данным

Паразит	Регион							
	Англия	Германия	Италия	Северная Греция	Республика Беларусь	Вологодская область	Республика Мордовия	Самарская область
Тип Plathelminthes Gegenbaur, 1859								
<i>Diplodiscus subclavatus</i> (Pallas, 1760)					+			+
<i>Paralepoderma cloacicola</i> (Luhe, 1909), met.								+
<i>Pharyngostomum cordatum</i> (Diesing 1850), met.								+
<i>Strigea</i> sp., met. Abildgaard, 1790								+
<i>Strigea sphaerula</i> (Rudolphi, 1803) Szidat, 1928					+			
<i>Clinostomum. spp</i> Leidy, 1856			+					
<i>Opisthioglyphe ranae</i> (Frohlich, 1791)					+			
<i>Pleurogenoides medians</i> (Olsson, 1876)					+			+
<i>Alaria alata</i> (Schränk, 1788) Krause, 1914					+			+
<i>Parastrigea robusta</i> Szidat, 1928		+						
Тип Nematoda Cobb, 1932								
<i>Oswaldocruzia filiformis</i> Goeze, 1782		+		+	+	+	+	+
<i>Megalobatrachonema terdentatum</i> (Linstow, 1890)	+	+				+		+
<i>Cosmocerca ornata</i> (Dujardin, 1845) Diesing, 1861					+			
<i>Agamospirura</i> Henry, Sisoff 1913 sp., larvae					+			
<i>Cosmocerca longicauda</i> (Linstow, 1885)		+						
Тип Acanthocephala Kölr., 1771								
<i>Acanthocephalus anthuris</i> (Dujardin, 1845)	+							
Автор	Avery, 1971	Sinsch <i>et al.</i> , 2018a, Sinsch <i>et al.</i> , 2018b	Caffara, 2014	Sattmann, 1990	Шималов, 2009	Шабунов, Радченко, 2012	Ручин, Чихляев, 2016	Файзуллин и др., 2011, Чихляев и др., 2018, Кириллов и др., 2018

половозрелых животных *Triturus cristatus* (Laurenti, 1768) нематодой *M. terdentatum* начинается уже при температуре воды 16.9°C и выше. В отличие от гребенчатого тритона, *L. vulgaris* является менее стенопотным видом, и его размножение начинается раньше при более низких температурах ($t = +8^{\circ}\text{C}$) (Вершинин, 2007). В урбоценозах, нерестовые водоемы прогреваются быстрее (Вершинин, 2007), что создает оптимальные условия для развития как тритонов, так и нематоды *M. terdentatum*. Таким образом, вероятнее всего, благоприятный температурный режим, а также наличие активного питания

в водную фазу жизненного цикла, влияет на вероятность заражения *L. vulgaris* данным видом.

Другим видом гельминтов является нематода *O. filiformis*, широко распространенная в Палеарктике, паразитирующая на большом спектре амфибий и рептилий (Рыжиков и др., 1980; Ваккер, 2018). Обыкновенные тритоны заражаются *O. filiformis* перорально при случайном контакте с инвазионными личинками на суше (Hendrikx, 1983).

Зараженность *L. vulgaris* нематодой *O. filiformis* низкая, однако этот вид гельминта по доле в ком-

понентном сообществе находится на втором месте. Показано (Kirillova *et al.*, 2021), что наибольшая инвазированность отмечена для серой жабы (*Bufo bufo* Linnaeus, 1758) как вида, имеющего большие размеры и ведущего преимущественно наземный образ жизни. Вероятно, одной из причин низких показателей зараженности являются небольшие размеры обыкновенного тритона и сравнительно большая продолжительность водной фазы.

Заражение *O. filiformis* обыкновенных тритонов происходит в наземную фазу жизненного цикла при случайном заглатывании с объектами питания. Наиболее благоприятные условия существования обыкновенных тритонов на суше — это особые микроклиматические условия, обеспечиваемые высотой и плотностью травостоя (Вершинин, 2007). Показано (Ваккер, 2018), что для развития яиц нематоды *O. filiformis* нужны оптимальные условия: это биотопы с достаточной влажностью почвы, температурой воздуха около +14...+15°C, плотного растительного покрова на ней, отдельно стоящих деревьев, создающих тень, кустарников и тростника, необходимых для передвижения личинок данной нематоды. Таким образом, еще одной из причин заражения обыкновенных тритонов нематодой *O. filiformis*, кроме размеров животного, является высота травостоя, по которому мигрируют личинки нематоды.

N. brevicaudatum, larvae Zeder, 1800 — один из паразитов, встречающихся у представителей герпетофауны Европы (Borkovcová, Kopriva, 2005; Yildirimhan *et al.*, 2005; Saglam, Arkan, 2006; Jones *et al.*, 2012), отмечен у амфибий родов *Bombina* Oken, 1816, *Bufo* Laurenti, 1768, *Hyla* Laurenti, 1768, *Rana* Linné, 1758, *Triturus* Rafinesque, 1815 и иногда рептилий родов *Anguis* Linnaeus, 1758, *Natrix* Laurenti, 1768 (Shimalov, Shimalov, 2000; Jones *et al.*, 2012). Нематода, имеющая прямой жизненный цикл (личинки первой стадии из яиц выходят вне хозяина и далее развиваются и линяют дважды до третьей стадии заражения). Конечный хозяин заражается перорально, личинки можно обнаружить в тканях (Vashetko, Siddikov, 1999; Saeed *et al.*, 2007).

Заражение личинками *N. brevicaudatum* невелико, что, вероятно, связано, как и в случае с нематодой *O. filiformis*, с малыми размерами самого хозяина.

Одним из простейших, заселяющих пищеварительный тракт амфибий, является *C. dimidiata* (Wahab *et al.*, 2008). Полагают, что этот вид состоит в эндосимбиотических отношениях со своими хозяевами, не оказывая никаких негативных эффектов, несмотря на обнаружение их в большом количестве (Poynton, Whitaker, 2001, цит по: Mohammad *et al.*, 2013).

Показано (McConnachie, 1960), что заселение амфибий представителями класса Opalineae происходит в период размножения и зависит от секреции гормонов хозяина. После выхода из спячки амфибии начинают активно питаться, с ростом продолжительности светового дня повышается выработка гонадотропина. Еще одним фактором, влияющим на активность гипофиза, выделяющего гонадотропин, у половозрелых особей является увеличение температуры среды в весенний период (McConnachie, 1960).

Температура среды, а также самих хозяев оказывает влияние на морфологические и физиологические особенности простейших (Михальченко, 1958; Суханова, 1953, 1963, цит по: Суханова, 1968).

На примере *Opalina ranarum* (Purkinje et Valentin, 1835) показано, что у головастика, сеголеток и половозрелых лягушек среднее время выживания цист простейших выше в водоеме с более высокой температурой воды (Суханова, 1968).

Высокие показатели инвазии эндосимбиотическими простейшими *C. dimidiata*, вероятно, связаны с синхронизацией жизненных циклов хозяина и простейших в период размножения, в том числе и с температурным режимом водоема — в мае вода начинает прогреваться, что влияет на размножение и выживаемость цист простейших.

Наблюдается тренд к увеличению показателей инвазии эндосимбионтами у обыкновенных тритонов в градиенте урбанизации (к зоне III), что может быть связано с тепловым загрязнением, характерным для урбоценозов. На городских территориях примерно на 1–2°C выше, чем за городом, соответственно, на селитебной территории майские среднемесячные температуры водоемов выше примерно на 3°C, чем в лесопарковой зоне и в природных территориях (Вершинин, 2014).

Специфика видового состава паразитарного комплекса обыкновенного тритона на восточном склоне Урала определяется лимитированностью распространения вида за пределами Европы (Skorinov *et al.*, 2008), температурным режимом на севере и влагообеспеченностью на юге (Терентьев, Чернов, 1949; Кузьмин, 2012).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При продвижении на восток ареала обыкновенного тритона происходит смена климатических зон, растительных сообществ, меняется термо- и влагообеспеченность территорий. Восточный склон Урала в этом смысле характеризуется усилением континентальности климата, что оказывает влияние на видовой состав и разнообразие паразитофауны обыкновенного тритона. Антропогенные модификации сообществ отличаются от природных большей термообеспеченностью, но

недостаточной влажностью, что сказывается на выживаемости гельминтов с прямым жизненным циклом (*O. filiformis*, *N. brevicaudatum*, larvae) в сравнении с *M. terdentatum*, развитие которой происходит со сменой резервуарных хозяев.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность И. В. Братцевой за помощь в подготовке списка литературы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН (№ госрегистрации темы 122021000082-0).

ЭТИЧЕСКОЕ ОДОБРЕНИЕ

Разрешение на сбор этого вида в России нет. не-обходимый. Животные были собраны, обработаны и подвергнуты эвтаназии. в соответствии с национальными правилами Российской Федерации от 1977 г. и второй частью Отчета Рабочей группы DGXT ЕС (1997 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Берзин Д.Л., Буракова А.В. Особенности диеты гребенчатого тритона *Triturus cristatus* (Laurenti, 1768) на восточной границе ареала // Экология. 2022. № 3. С. 221–227. <https://doi.org/10.31857/S0367059722030040>
- Бреев К.А. Применение математических методов в паразитологии // Изв. ВНИИОРХ. 1976. Т. 105. С. 109–126.
- Ваккер В.Г. Паразитарная система нематоды *Oswaldocruzia filiformis* (Strongylida: Molineidae) в Казахстане // Принципы экологии. 2018. № 4. С. 44–64.
- Вершинин В.Л. Амфибии и рептилии Урала. Екатеринбург: УрО РАН, 2007. 171 с.
- Вершинин В.Л. Экология города. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2014. 88 с.
- Ивашкин В.М., Контримавичус В.М., Назарова Н.С. Методы сбора и изучения гельминтов наземных позвоночных млекопитающих. М.: Наука, 1971. 123 с.
- Кидов А.А., Петровский А.Б., Шпагина А.А., Степанкова И.В. Современное распространение обыкновенного (*Lissotriton vulgaris*) и гребенчатого (*Triturus cristatus*) тритонов в “старой” Москве и перспективы их сохранения // Экосистемы. 2021. Т. 25. С. 114–124.
- Кириллов А.А. Сообщества гельминтов обыкновенного ужа *Natrix natrix* L. (Reptilia: Colubridae) юга Северного Поволжья // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2011. Т. 13. № 1. С. 127–134.
- Кириллов А.А., Кириллова Н.Ю., Чихляев И.В. Паразиты позвоночных животных Самарской области. Тольятти: Полиар, 2018. 304 с.
- Кузьмин С.Л. Земноводные бывшего СССР. М.: КМК, 2012. 370 с.
- Решетников А.Н. Влияние интродуцированной рыбы ротана *Perccottus glenii* (Odontobutidae, Pisces) на земноводных в малых водоемах Подмосковья // Журн. общ. биол. 2001. Т. 62. № 4. С. 352–361.
- Ручин А.Б., Чихляев И.В. Экология земноводных и пресмыкающихся Мордовии. Сообщение 3. Тритон обыкновенный, *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus, 1758) // Тр. Мордов. гос. природ. заповедника. 2016. Вып. 16. С. 419–430.
- Рыжиков К.М., Шарпило В.П., Шевченко Н.Н. Гельминты амфибий фауны СССР. М.: Наука, 1980. 275 с.
- Суханова К.М. Температурные адаптации у простейших. Л.: Наука, 1968. 267 с.
- Терентьев П.В., Чернов С.А. Определитель пресмыкающихся и земноводных. М.: Сов. наука, 1949. 340 с.
- Файзулин А.И., Чихляев И.В., Кузовенко А.Е. Обыкновенный тритон *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus, 1758) (Caudata, Amphibia) в Самарской области // Самарская Лука: пробл. регион. и глоб. экологии. 2011. Т. 20. № 1. С. 104–110.
- Файзулин А.И., Кузовенко А.Е. Видовой состав и особенности распространения земноводных в черте г. Самара // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2015. Т. 17. № 4. С. 153–156.
- Чихляев И.В. Материалы к гельминтофауне обыкновенного тритона *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus, 1758) в Самарской области // Актуальные проблемы герпетологии и токсикологии: сб. науч. тр. Тольятти: ИЭВБ РАН, 2007. Вып. 10. С. 180–184.
- Чихляев И.В., Кириллова Н.Ю., Кириллов А.А. Обзор гельминтов земноводных (Amphibia) Самарской области // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2018. Т. 20. № 5 (3). С. 385–400.
- Шабунцов А.А., Радченко Н.М. Паразиты рыб, земноводных и чайковых птиц в экосистемах крупных водоемов Вологодской области. Вологда: ВоГТУ, 2012. 243 с.
- Шималов В.В. Гельминтофауна амфибий (Vertebrata: Amphibia) в Республике Беларусь // Паразитология. 2009. Вып. 43. Ч. 2. С. 118–129.
- Avery R.A. Helminth parasite populations in newts and their tadpoles // Freshwater Biology. 1971. V. 1. P. 113–119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1971.tb01549.x>
- Berger L., Speare R., Daszak P., Green D.E., Cunningham A.A., Goggin C.L., Slocumbe R., Ragan M.A.,

- Hyati A.D., McDonald K.R., Hines H.B., Lips K.R., Marantelli G., Parkes H. Chytridiomycosis Causes Amphibian Mortality Associated with Population Declines in the Rain Forests of Australia and Central America // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998. V. 95. № 15. P. 9031–9036.
URL: <http://www.jstor.org/stable/45880>
- Blaustein A.R., Kiesecker J.M. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations // Ecology Letters. 2002. V. 5. P. 597–608.
<https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2002.00352.x>
- Borkovcová M., Kopriva J. Parasitic helminthes of reptiles (Reptilia) in South Moravia (Czech Republic) // Parasitology Research. 2005. V. 95. P. 77–78.
<https://doi.org/10.1007/s00436-004-1258-6>
- Caffara M., Bruni G., Paoletti C., Gustinelli A., Fioravanti M.L. Metacercariae of *Clinostomum complanatum* (Trematoda: Digenea) in European newts *Triturus carnifex* and *Lissotriton vulgaris* (Caudata: Salamandridae) // J. of Helminthology. 2014. V. 88. P. 278–285.
<https://doi.org/10.1017/S0022149X13000151>
- Hendrikx W.M.L. Observations on the routes of infection of *Oswaldocruzia filiformis* (Nematoda: Trichostrongylidae) in amphibian // Zeitschrift für Parasitenkunde. 1983. V. 69. № 1. P. 119–126.
<https://doi.org/10.1007/BF00934016>
- Houlahan J.E., Findlay C.S., Schmidt B.R., Meyer A.H., Kuzmin S.L. Quantitative evidence for global amphibian population declines // Nature. 2000. V. 404. P. 752–755.
<https://doi.org/10.1038/35008052>
- Jones R., Brown D.S., Harris E., Jones J., Symondson W.O.C., Bruford M.W., Cable J. First record of *Nexosomatium brevicaudatum* through the non-invasive sampling of *Anguis fragilis*: complementary morphological and molecular detection // J. of Helminthology. 2012. V. 86. P. 125–129.
<https://doi.org/10.1017/S0022149X11000174>
- Kinne O. Successful re-introduction of the newts *Triturus cristatus* and *T. vulgaris* // Endang Species Res. 2006. V. 1. P. 25–40.
<https://doi.org/10.3354/esr001025>
- Kirillova N. Yu., Kirillov A.A., Chikhlyayev I.V. Morphological variability of *Oswaldocruzia filiformis* (Nematoda: Molineidae) in amphibians from European Russia // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 818 (2021). 2021. V. 818. Art. № 012018.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/818/1/012018>
- McConnachie E.W. Experiments on the encystation of *Opalina* in *Rana temporaria* // J. Parasitology. 1960. V. 50. № 1/2. P. 171–181.
<https://doi.org/10.1017/S0031182000025270>
- Mohammad K.N., Badrul M.M., Mohamad N., Zainal-Abidin, A.H. Protozoan parasites of four species of wild anurans from a local zoo in Malaysia // Tropical Biomedicine. 2013. V. 30. № 4. P. 615–620.
- Petter A.J., Chabaud A.G. Life-cycle of *Megalobatrachonema terdentatum* (Linstow) in France // Annales de Parasitologie Humaine et Comparee. 1971. V. 46. № 4. P. 463–477.
- Rozsa L., Reczigel J., Majoros G. Quantifying parasites in samples of hosts // J. of Parasitology. 2000. V. 86. P. 228–232.
<https://doi.org/10.2307/3284760>
- Saeed I., Al-Barwari S.E., Al-Harmni K.I. Metazoan parasitological research of some Iraqi amphibians // Türkiye Parazitoloji Dergisi. 2007. V. 31. № 4. P. 337–345.
- Saglam N., Arikan H. Endohelminth fauna of the marsh frog *Rana ridibunda* from Lake Hazar, Turkey // Diseases of Aquatic Organisms. 2006. V. 72. P. 253–260.
<https://doi.org/10.3354/dao072253>
- Sattmann H. Endohelminths of some amphibians from Northern Greece (Trematoda, Acanthocephala, Nematoda; Amphibia: *Triturus*, *Rana*, *Bombina*) // Herpetozoa. 1990. V. 3. № 1/2. P. 67–71.
- Sessions S.K., Ruth S.B. Explanation for naturally occurring supernumerary limbs in amphibians // J. of Experimental Zoology. 1990. V. 254. P. 38–47.
<https://doi.org/10.1002/jez.1402540107>
- Shimalov V.V., Shimalov V.T. Helminth fauna of snakes (Reptilia, Serpentes) in Belorussian Polesye // Parasitol. Res. 2000. V. 86. № 4. P. 340–341.
<https://doi.org/10.1007/s004360050055>
- Sinsch U., Kaschek J., Wiebe J. Heavy metacercariae infestation (*Parastrigea robusta*) promotes the decline of a smooth newt population (*Lissotriton vulgaris*) // Salamandra. 2018a. V. 54. № 3. P. 210–221.
- Sinsch U., Heneberg P., Těšínský M., Balczun C., Scheid P. Helminth endoparasites of the smooth newt *Lissotriton vulgaris*: linking morphological identification and molecular data // J. of Helminthology. 2018b. V. 93. № 3. P. 332–341.
<https://doi.org/10.1017/S0022149X18000184>
- Skorinov D.V., Kuranova V.N., Borkin L.J., Litvinchuk S.N. Distribution and Conservation Status of the Smooth Newt (*Lissotriton vulgaris*) in Western Siberia and Kazakhstan // Rus. J. of Herpetology. 2008. V. 15. № 2. P. 157–165.
- Vashetko E.V., Siddikov B.H. The effect of the ecology of toads on the distribution of helminths // Turkish J. of Zoology. 1999. V. 23. P. 107–110.
- Vershinin V.L., Vershinina S.D., Berzin D.L., Zmeeva D.V., Kinev A.V. Long-term observation of amphibian populations inhabiting urban and forested areas in Yekaterinburg, Russia // Scientific Data. 2015. V. 2. Art. № 150018.
<https://doi.org/10.1038/sdata.2015.18>
- Wahab A.R., Andy T.W.A., Intan S. On the parasitic fauna of two species of anurans collected from Sungai Pinang, Penang Island, Malaysia // Tropical Biomedicine. 2008. V. 25. № 2. P. 160–165.

Wake D.B., Vredenburg V.T. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008. V. 105. P. 11466–11473.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0801921105>

Yildirimhan H.S., Karadeniz E., Gürkan E., Koyun M. Metazoan parasites of the marsh frog (*Rana ridibunda* Pallas 1771; Anura) collected from the different regions in Turkey // Türkiye Parazitoloji Dergisi. 2005. V. 29. P. 135–139.

Analysis of Parasitofauna and Endosymbionts of *Lissotriton Vulgaris* L., 1758 (CAudata, Salamandridae) in Natural and Urban Gradients of the Environment

A. V. Burakova^{1, #}, D. L. Berzin¹, V. L. Vershinin^{1,2}

¹*Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of Russian Academy of Sciences,
st. March 8, 202, Yekaterinburg, 620144 Russia*

²*Ural Federal University, Institute of Natural Sciences and Mathematics, st. Mira, 19, Yekaterinburg, 620002 Russia*

[#]*e-mail: annabios@list.ru*

The analysis of the parasitic and endosymbiontfauna of the common newt (*Lissotriton vulgaris* L., 1758) in the natural and urban landscapes of the Middle Urals is presented for the first time. Four species of helminthes belonging to the Nematoda type were found, including 1 taxon indeterminate to the species (*Nematoda* sp.), and 1 species of endosymbionts (Chromista type). The works devoted to the species composition of *L. vulgaris* parasites on the territory of Eurasia are analyzed. The fauna of the helminthes of the common newt on the eastern slope of the Urals is depleted, which is probably determined by the limited distribution of the species outside Europe, the temperature regime in the north and moisture availability in the south.

Keywords: common newt, helminthes, urbocenosis, natural gradient of the environment

ВЛИЯНИЕ СТЕАРИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ЭМБРИОНОВ ДОМАШНЕЙ КОШКИ (*FELIS SILVESTRIS CATUS*)

© 2024 г. Е. Ю. Брусенцев*, С. В. Окотруб*, Д. А. Лебедева*, **, ***, К. А. Окотруб**,
Т. А. Рахманова*, **, ***, С. Я. Амстиславский*, **, @

*Институт цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН, просп. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

**Институт автоматики и электрометрии (ИАиЭ) СО РАН, просп. Коптюга, 1, Новосибирск, 630090 Россия

***Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
ул. Пирогова, 1, Новосибирск, 630090 Россия

@E-mail: amstis@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.02.2023 г.

После доработки 02.05.2023 г.

Принята к публикации 04.05.2023 г.

Данная работа направлена на изучение воздействия насыщенной стеариновой кислоты (СК) в условиях культивирования *in vitro* на эмбрионы домашней кошки (*Felis silvestris catus*) и оценку того, как изменение состава внутриклеточных липидов отражается на результатах криоконсервации. Добавление СК в культуральную среду не влияло на развитие эмбрионов кошек *in vitro* до криоконсервации. Также не было выявлено изменений по общему количеству липидов в эмбрионах после воздействия СК. Между тем степень ненасыщенности липидов была снижена в эмбрионах после культивирования *in vitro* с СК. Более того, температура начала фазового перехода липидов (T^*) выше по сравнению с контролем у эмбрионов, подвергнутых воздействию СК. Снижение эффективности криоконсервации эмбрионов при культивировании с СК было ассоциировано с уменьшением степени ненасыщенности внутриклеточных липидов и повышением T^* . Результаты могут иметь значение для консервации генетических ресурсов видов подсемейства Felinae.

Ключевые слова: Felidae, экстракорпоральное оплодотворение, раннее развитие, культивирование *in vitro*, внутриклеточные липиды, жирные кислоты, программное замораживание, спектроскопия комбинационного рассеяния света

DOI: 10.31857/S1026347024010083, **EDN:** LPLLRN

У ряда млекопитающих, в частности у таких важных сельскохозяйственных животных, как свинья (*Sus scrofa*, L., 1758), лошадь (*Equus caballus*, L., 1758), а также у всех изученных представителей отряда Carnivora ооциты и преимплантационные эмбрионы содержат большое количество внутриклеточных липидов (Genicot *et al.*, 2005; Amstislavsky *et al.*, 2019; Lawson *et al.*, 2022). Для большинства из этих видов существуют проблемы, связанные с криоконсервацией их эмбрионов (Nagashima *et al.*, 1995; Amstislavsky *et al.*, 2019; Borges, Vireque, 2019; Idrissi *et al.*, 2021). Поиск механизмов, лежащих в основе низкой криоустойчивости эмбрионов богатых липидами, важен для зоологии и сравнительной эмбриологии, а в практическом плане необходим для успешной консервации генетических ресурсов ряда видов млекопитающих (Abe *et al.*, 2002; Амстиславский и др., 2017; Amstislavsky *et al.*,

2019; Borges, Vireque, 2019; Idrissi *et al.*, 2021; Igonina *et al.*, 2021).

Семейство Felidae включает множество уязвимых и исчезающих видов (IUCN, 2021). Домашняя кошка (*Felis silvestris catus*, L., 1758) является модельным объектом для исследований, направленных на реализацию концепции сохранения генетических ресурсов диких видов кошачьих путем криоконсервации гамет и эмбрионов (Amstislavsky *et al.*, 2018; Mokrousova *et al.*, 2020a; 2020b; Окотруб и др., 2022). В ооцитах и преимплантационных эмбрионах исследованных видов кошачьих содержится большое количество внутриклеточных липидов (Crichton *et al.*, 2003; Kochan *et al.*, 2021; Zahmel *et al.*, 2021). Эксперименты, проводимые на домашней кошке, могут способствовать пониманию особенностей криоконсервации эмбрионов других представителей семейства кошачьих.

Внутриклеточные липидные гранулы (ЛГ) чувствительны к охлаждению и могут подвергаться негативному влиянию криоконсервации (Abe *et al.*, 2002; Amstislavsky *et al.*, 2019; Okotrub *et al.*, 2021), хотя механизмы криоповреждений в эмбрионах, богатых липидами, остаются слабо изученными. Известно, что фазовый переход воды во время процесса охлаждения связан с повреждением клеток и снижением их жизнеспособности (Mazur, 1990). Подобно кристаллизации водного раствора при охлаждении, в клетках эмбрионов происходит и фазовый переход липидов (ФПЛ), которые содержатся в больших количествах в ЛГ (Amstislavsky *et al.*, 2019). Это может инициировать повреждения, связанные с перераспределением и упорядочением молекул липидов (Okotrub *et al.*, 2018). Одной из стратегий снижения повреждения клеток является полное или частичное удаление из них внутриклеточных липидов (Nagashima *et al.*, 1995; Galiguis *et al.*, 2014; Borges, Vireque, 2019). Другая стратегия состоит в том, чтобы изменить липидный состав ЛГ и тем самым улучшить результаты криоконсервации ооцитов и преимплантационных эмбрионов. В некоторых исследованиях показано, что воздействие *in vitro* ненасыщенными жирными кислотами (ЖК), в частности линолевой (ЛК) и олеиновой кислот (ОК), улучшает развитие эмбрионов и повышает их жизнеспособность после криоконсервации у разных видов млекопитающих (Fayez *et al.*, 2018; Karasahin, 2019; Yousif *et al.*, 2020). Насыщенные ЖК оказывают противоположное влияние на развивающиеся эмбрионы млекопитающих (Shehab-el-Deen *et al.*, 2009; Van Hoesck *et al.*, 2011; Aardema *et al.*, 2022). Например, воздействие *in vitro* пальмитиновой (ПК) и/или стеариновой кислот (СК) увеличивает уровень апоптоза и уменьшает число клеток у эмбрионов крупного рогатого скота и негативно влияет на их развитие (Van Hoesck *et al.*, 2011; Desmet *et al.*, 2016; Aardema *et al.*, 2022). Более того, криоустойчивость эмбрионов крупного рогатого скота значительно ниже после созревания *in vitro* ооцитов и/или при культивировании *in vitro* таковых с СК (Shehab-el-Deen *et al.*, 2009; Aardema *et al.*, 2022).

В работе на ооцитах домашней кошки показано, что во время их охлаждения внутриклеточные ЛГ подвергаются фазовому переходу и фазовой сепарации. После охлаждения более насыщенные липиды в составе ЛГ подвергаются фазовой сепарации раньше, чем ненасыщенные (Mokrousova *et al.*, 2020a). В недавней работе на ооцитах домашних кошек было показано, что после добавления СК во время их созревания *in vitro* и последующей криоконсервации при помощи программного замораживания, часть насыщенных липидов может оставаться в упорядоченном конформационном состоянии после оттаивания (Okotrub *et al.*, 2021). Тем не менее влияние СК в ходе культивирования *in vitro* эмбрионов домашних кошек на их

жизнеспособность после криоконсервации проверено не было.

Существуют отдельные наблюдения, показывающие, что снижение температуры начала ФПЛ (T^*) повышает криоустойчивость репродуктивных клеток (Zeron *et al.*, 2002). На нескольких видах млекопитающих выявлено, что T^* зависит от степени ненасыщенности липидов (Zeron *et al.*, 2002; Igonina *et al.*, 2021; Окотруб и др., 2022). В нашей работе на эмбрионах домашней кошки показано, что воздействие на них ЛК при культивировании *in vitro* вызывает увеличение степени ненасыщенности внутриклеточных липидов, что в свою очередь приводит к снижению T^* и более эффективной криоконсервации эмбрионов домашних кошек (Окотруб и др., 2022). В настоящей работе мы планируем проверить, как сдвиг в противоположном направлении — в сторону более насыщенных внутриклеточных липидов — будет влиять на T^* и на эффективность криоконсервации эмбрионов домашних кошек.

Целью данного исследования являлось: 1) определить общее содержание и степень ненасыщенности внутриклеточных липидов эмбрионов домашней кошки после культивирования *in vitro* с насыщенной СК; 2) измерить T^* во время охлаждения эмбрионов домашней кошки после воздействия СК; 3) оценить влияние СК на развитие эмбриона *in vitro*; 4) исследовать эффективность криоконсервации эмбрионов домашней кошки после культивирования *in vitro* с СК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

Семенники с эпидидимисами котов, а также яичники кошек получены после плановой орхиэктомии/овариогистерэктомии в центре льготной стерилизации животных г. Новосибирска и доставлены в лабораторию в течение двух часов. Яичники немедленно помещали в среду Collect, т.е. среду M199 (Merck, Германия) с добавлением 20 мМ буфера HEPES (Merck, Германия), 2,2 мМ пирувата натрия (Merck, Германия), 2,2 мМ лактата натрия (Merck, Германия), 3 г/л бычьего сывороточного альбумина — БСА (Merck, Германия) и 50 мкг/мл гентамицина (Синтез АКО, Россия); хранили при 4°C не более четырех часов. Семенники с эпидидимисами немедленно помещали в стерильные сухие пробирки и хранили при 4°C до 24 ч с момента операции. Все исследования соответствовали Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (ETS № 123).

Дозревание ооцитов *in vitro*

Кумулус-ооцитные комплексы (КОК) выделяли из фолликулов яичников взрослых беспородных

кошек ($n = 49$), как описано ранее (Mokrousova *et al.*, 2020б; Окотруб и др., 2022), в подогретую до 38.5°C среду Collect с использованием стереомикроскопа S8 APO (Leica Microsystems, Германия). Ооциты с темной и гомогенной цитоплазмой, окруженные пятью или более слоями клеток кумулюса, промывали для удаления дебриса и отбирали для созревания *in vitro*. Дозревание осуществляли в среде M199 с добавлением 15 мМ бикарбоната натрия (Merck, Германия), 2.2 мМ пирувата натрия, 2.2 мМ лактата натрия, 3 г/л БСА, 50 мкг/мл гентамицина, 2 МЕ/мл гонадотропина сыворотки жеребых кобыл – “Фоллигон” (Intervet, Нидерланды) и 10 МЕ/мл хорионического гонадотропина человека – “Хорулон” (Intervet, Нидерланды). Далее КОКи (по 10–15 на лунку) переносили в 4-луночные планшеты (Nunc, США) с предварительно уравновешенной средой для созревания под минеральным маслом FertiCult Mineral Oil (FertiPro, Бельгия) и помещали в CO_2 -инкубатор New Brunswick™ Galaxy 48R (Eppendorf, Германия) при 38.5°C , 5% CO_2 и влажности 90% на 24 ч.

Получение сперматозоидов и экстракорпоральное оплодотворение

Сперматозоиды были получены из каудальных частей эпидидимисов взрослых беспородных котов ($n = 5$), как описано ранее (Brusentsev *et al.*, 2018). Каудальные части эпидидимисов извлекали, переносили на чашку Петри (Corning, США) в 1000 мкл среды Collect и измельчали при 38.5°C . Образцы эпидидимального семени наносили на верхний мениск среды Isolate Sperm Separation Medium (FUJIFILM Irvine Scientific, США) с градиентом плотности 40: 80% и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 мин. Осадок собирали и перемешивали с 1000 мкл среды Collect, центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин для удаления оставшихся коллоидных частиц. Супернатант удаляли, а осадок со сперматозоидами использовали для экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Концентрацию сперматозоидов и их подвижность определяли в счетной камере Маклера – Makler Chamber (Origio, Дания). Созревшие ооциты переносили в 4-луночные планшеты с предварительно уравновешенной средой Ham's F-10 (Merck, Германия) с добавлением 5% фетальной телячьей сыворотки (Merck, Германия) и 50 мкг/мл гентамицина под минеральным маслом FertiCult Mineral Oil (FertiPro, Бельгия). Суспензию сперматозоидов с концентрацией $1 \cdot 10^6$ подвижных сперматозоидов/мл добавляли к 10–15 ооцитам в лунку планшета объемом 500 мкл и инкубировали в CO_2 -инкубаторе New Brunswick™ Galaxy 48R (Eppendorf, Германия) при 38.5°C , 5% CO_2 и влажности 90% в течение 21 ч.

Приготовление раствора стеариновой кислоты

Раствор стеариновой кислоты готовили в соответствии с опубликованным ранее протоколом (Ranneva *et al.*, 2020) с небольшими модификациями. Смешивали 0.01 М СК (Merck, Германия) с 0.01 М гидроксидом калия (“ХимМед”, Россия) на водяной бане при 90°C в течение 60 мин с последующей гомогенизацией ультразвуком (60 мин) на Sonicator Q700 (Qsonica, США) с получением 0.01 М раствора стеарата калия. Сеансы нагревания и гомогенизации ультразвуком чередовали несколько раз в течение 5–6 ч до достижения необходимой консистенции мыльного раствора. Полученный раствор инкубировали с 3.3 мМ БСА (свободного от ЖК) с получением 5 мМ раствора СК-БСА в соотношении 3: 1. Приготовленную смесь добавляли в культуральную среду до конечной концентрации 400 мкМ.

Культивирование эмбрионов in vitro

Дизайн эксперимента представлен графически на рис. 1.

Двухклеточные эмбрионы, полученные после ЭКО, были случайным образом распределены между двумя группами: контрольной ($n = 48$) и экспериментальной (СК; $n = 46$). Культивирование проводили в 20 мкл среды CSCM–C (FUJIFILM Irvine Scientific, США) с добавлением 400 мкМ СК (СК-группа) и без нее (контроль) в CO_2 -инкубаторе Galaxy 48R (Eppendorf, Германия) при 38.5°C , 5% CO_2 и влажности 90% в течение 66 ч. Сразу после этого периода культивирования *in vitro* 17 и 19 эмбрионов (из контрольной и СК-группы соответственно) фиксировали в 400 мкл 4%-го параформальдегида (“ХимМед”, Россия), pH 7.4–7.6, разведенного в фосфатно-солевом буфере – PBS (“Росмедбио”, Россия), с предварительной отмывкой в трех каплях PBS (по 3 мин в каждой капле). Развитие эмбрионов оценивали с помощью окрашивания DAPI с последующей флуоресцентной микроскопией. После культивирования *in vitro* в течение 66 ч с СК ($n = 8$) или без нее ($n = 11$) в эмбрионах оценивали общее содержание липидов с помощью окрашивания нильским красным (Nile Red) и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ). Восемь эмбрионов (пять из контрольной и три из СК-группы) использовали для изучения степени ненасыщенности липидов и T^* с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния света (КРС).

Эмбрионы как в контрольной группе ($n = 18$), так и в СК-группе ($n = 13$) после 66 ч культивирования *in vitro* замораживали, затем оттаивали, культивировали в течение дополнительных 30 ч и фиксировали, как описано выше. Общее время культивирования этих эмбрионов составило 96 ч.

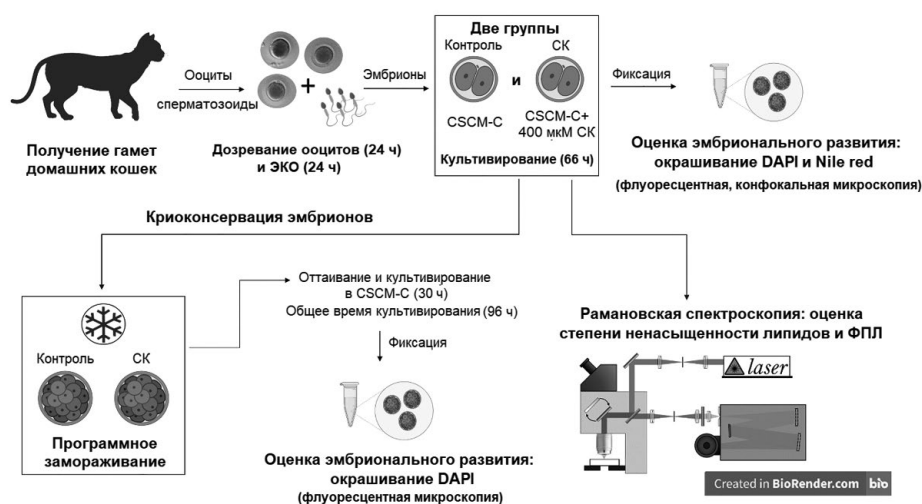


Рис. 1. Дизайн эксперимента. ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение; ФЛП – фазовый переход липидов.

Развитие эмбрионов до и после криоконсервации оценивали с помощью окрашивания DAPI с последующей флуоресцентной микроскопией.

Криоконсервация эмбрионов

Для программного замораживания эмбрионов использовали раствор криопротектора, содержащий 10% пропиленгликоля – ПГ (“ХимМед”, Россия) в среде Collect. Эмбрионы как контрольной, так и СК-группы переносили в среду Collect на 5 мин, после чего переносили в раствор криопротектора, разбавленный средой Collect в соотношении 1:1 на 5 мин; затем в неразбавленный раствор криопротектора еще на 5 мин, после чего помещали в 0.25-мл пластиковую соломинку (CryoBioSystem, Франция). Все эти процедуры уравнивания проводили при комнатной температуре. Соломинку с эмбрионами помещали в программный замораживатель CL-8800 (CryoLogic, Австралия) при 0°C, охлаждали со скоростью 2°C/мин до –8°C и выдерживали в течение 5 мин. В этот период прикасались к верхней части соломинки (под пыжом и к верхнему мениску второго сектора) предварительно охлажденным в жидком азоте (LN₂) пинцетом для инициации кристаллизации льда. Затем охлаждение возобновляли со скоростью 0.3°C/мин до –40°C, после чего со скоростью 6°C/мин до –80°C. После этого соломинки с эмбрионами помещали в LN₂. Для оттаивания соломинки извлекали из LN₂, выдерживали на воздухе при комнатной температуре в течение 40 с, а затем в течение 40 с на водяной бане при 30°C, как описано ранее (Renard, Babinet, 1984). Эмбрионы отмывали от криопротектора, перенося их между каплями растворов с разным соотношением 10% ПГ и 1М сахарозы (“ХимМед”,

Россия) на основе среды Collect (по шесть минут в каждой капле): 1) 40 мкл 10% ПГ и 20 мкл 1 М сахарозы, 2) 40 мкл 10% ПГ, 20 мкл 1 М сахарозы и 30 мкл Collect, 3) 20 мкл 1 М сахарозы и 60 мкл Collect, 4) 50 мкл Collect.

Окрашивание эмбрионов DAPI и флуоресцентная микроскопия

Фиксированные эмбрионы трижды отмывали от параформальдегида при комнатной температуре в PBS с добавлением 1 мг/мл поливинилпирролидона – ПВП (Merck, Германия) в течение 5 мин, а затем инкубировали с 2 мг/мл DAPI в течение 5 мин. После этого эмбрионы снова отмывали и переносили на предметные стекла (“МиниМед”, Россия). Образцы оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Imager.M2 (Carl Zeiss, Германия) с фильтром, подходящим для окрашивания DAPI, камеры AxioCam 506 mono (Carl Zeiss, Германия) и программы ImageJ (США). Работу проводили в Центре коллективного пользования SPF-вивария Института цитологии и генетики – ИЦиГ СО РАН (<http://spf.bionet.nsc.ru>).

Для каждого эмбриона подсчитывали число интерфазных ядер (ИЯ), фрагментированных ядер (ФЯ) и общее число ядер (ОЯ), т.е. сумму ИЯ, ФЯ и митозов. Индекс фрагментации (ИФ) оценивали как долю ядерных фрагментов к общему числу ядер. По общему числу ядер (Roth *et al.*, 1994; Swanson *et al.*, 1994; Mokrousova *et al.*, 20206) эмбрионы были разделены на следующие группы: неразвивающиеся, остановившиеся в своем развитии (менее 8 ядер), эмбрионы на стадии дробления (9–16 ядер), ранние морулы (17–50 ядер) и поздние морулы (более 50 ядер).

*Окрашивание нильским красным
и конфокальная микроскопия*

Оценку изменений внутриклеточного содержания липидов у эмбрионов домашней кошки через 66 ч культивирования *in vitro* с СК и в контроле (без СК) проводили с использованием флуорохрома нильского красного — Nile Red (Merck, Германия) с последующей КЛСМ, как описано ранее (Genicot *et al.*, 2005; Igonina *et al.*, 2021; Окотруб и др., 2022). Фиксированные эмбрионы трижды отмывали от параформальдегида в PBS, содержащем 1 мг/мл ПВП, по 5 мин в каждой капле при комнатной температуре. Исходный раствор нильского красного (1 мг/мл) готовили при помощи разбавления красителя в диметилсульфоксиде (“ХимМед”, Россия) и разбавляли до рабочей концентрации 10 мкг/мл перед исследованием. Эмбрионы инкубировали в рабочем растворе в течение трех часов при 37°C для достижения максимальной интенсивности окрашивания внутриклеточных липидов, как описано ранее (Genicot *et al.*, 2005). Образцы помещали на предметные стекла (Thermo Fisher Scientific, США) в PBS. Изображения получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 NLO Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием программного обеспечения Zen 2012 Black Edition (Carl Zeiss, Германия). Эмбрионы, окрашенные нильским красным, облучали аргоновым газовым лазером с длиной волны 488 нм (максимальная мощность 30 мВт) при 0.1% максимальной мощности, которая оставалась постоянной во время процедуры. Спектры получали в диапазоне длин волн 494–687 нм с шагом 9 нм. Изображения получали с помощью 32-канального фотоумножителя с использованием режима сканирования Z-stack и Lambda. Все изображения получали в режиме подсчета фотонов (photon counting), подсчитывали сумму всех фотонов со ста оптических срезов на каждый эмбрион. Суммирование оптических срезов и вычитание фоновой флуоресценции выполняли с помощью программы ImageJ. Работу проводили в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckpmapo>).

Спектроскопия комбинационного рассеяния света

Спектроскопию КРС проводили на экспериментальной установке, состоящей из прямого микроскопа Orthoplan (Leitz, Германия), оснащенного сканирующим пьезопозиционером PXY-200 (Newport, США) и монохроматором SP2500i (Princeton Instruments, США), снабженным зарядным устройством, сопряженным с инструментальным детектором Spec-10:2K/LN (Princeton Instruments, США). Оптический криостат THMS350V (Linkam Scientific, Великобритания)

использовали для проведения измерений КРС при разных температурах. Источником монохроматического излучения для возбуждения комбинационного рассеяния света служил твердотельный лазер Excelsior (Spectra-Physics, США) с длиной волны 532.1 нм. Фокусировку лазерного луча в пятно диаметром ~1 мкм осуществляли с помощью $\times 60$ объектива CFI Plan Fluor 60XC (Nikon Instruments, Япония) с числовой апертурой 0.85. Мощность облучения после объектива составляла 20 мВт. Спектральное разрешение экспериментальной установки составляло 2.5 см^{-1} . Длины волн всех измеренных спектров калибровали с помощью неоновой газоразрядной лампы. Спектры комбинационного рассеяния света измеряли в диапазоне от 800 до 3200 см^{-1} .

Оценка вклада и степени ненасыщенности липидов

Пять контрольных и три эмбриона СК-группы, культивированных в течение 66 ч, исследовали методом спектроскопии комбинационного рассеяния света. Для изучения внутриклеточных липидов было исследовано 100 спектров комбинационного рассеяния от разных случайно выбранных локальных областей внутри эмбрионов. Из полученного набора данных, используя метод главных компонент, был извлечен вклад липидов. Поскольку наиболее интенсивный сигнал комбинационного рассеяния света исходит от липидных гранул, мы предполагаем, что полученная спектральная составляющая липидов в основном связана именно с ними. Метод выделения вклада липидов в спектры комбинационного рассеяния света был описан в нашей более ранней работе (Igonina *et al.*, 2021). Его принцип следующий: чтобы извлечь вклад липидов, мы уменьшили размерность данных КРС до трех основных главных компонент, связанных с вариацией в спектрах трех основных типов соединений: липидов, белков и воды, которые дают наиболее интенсивный вклад в измеряемые спектры. Затем подбирали такую линейную комбинацию этих компонент, чтобы результирующий спектр был свободен от пика фенилаланина при 1004 см^{-1} и полосы валентных колебаний ОН-группы воды на частотах выше 3050 см^{-1} . Поскольку в спектре комбинационного рассеяния света липидов отсутствуют линии на этих частотах, полученная комбинация главных компонент будет отражать липидный вклад в измеряемые спектры. Для оценки степени ненасыщенности липидов использовали соотношение интенсивностей линии валентных колебаний связей $\text{C}=\text{C}$ при 1657 см^{-1} к линии ножничных деформационных колебаний CH_2 (δCH). Интенсивность первой линии увеличивается с увеличением числа двойных связей $\text{C}=\text{C}$, интенсивность второй линии увеличивается с увеличением числа метиленовых групп. Для

характеристики ненасыщенности были использованы спектры комбинационного рассеяния, измеренные при $T = 25^\circ\text{C}$.

Измерение температуры начала фазового перехода липидов при охлаждении эмбрионов

Для изучения зависимости фазового состояния липидов от температуры эмбрионы помещали в раствор EmbryoMax KSOM (Merck, Германия) с добавлением 0.2 М сахарозы и 1.5 М ПГ. Охлаждение проводили до -7°C со скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$, затем инициировали образование льда, делали 10-минутную паузу для перекристаллизации льда. После этого образец охлаждали со скоростью $0.3^\circ\text{C}/\text{мин}$. При охлаждении делали дополнительные паузы ~20 мин для измерения спектров КРС. За изменением фазового состояния липидов следили по соотношению интенсивностей антисимметричных (aCH) и симметричных (sCH) валентных колебаний CH_2 при 2880 и 2850 см^{-1} соответственно. Эта особенность в спектрах КРС отражает изменение конформационного состояния липидов, происходящее при фазовом переходе. Поскольку фазовый переход уширен, отслеживали температуру начала фазового перехода (T^*), т.е. температуру, при которой появляется пик (Okotrub *et al.*, 2018). Предварительная обработка данных включала коррекцию всплесков интенсивности в измеренных спектрах и вычитание фона по линейной функции. Спектры анализировали и обрабатывали, как описано ранее (Okotrub *et al.*, 2018; Igonina *et al.*, 2021).

Статистический анализ

Данные проверяли на нормальное распределение с помощью критерия Шапиро – Уилка и анализировали с помощью стандартного пакета программ STATISTICA v 8.0 (StatSoft Inc., США). Группы с нормальным распределением сравнивали по t-критерию Стьюдента, в противном случае по U-критерию Манна – Уитни. Такие параметры, как доля эмбрионов на разных стадиях развития до и после замораживания, сравнивали с помощью критерия хи-квадрат. Данные по индексу фрагментации ядер до криоконсервации, числу клеток в морулах и бластоцистах до и после криоконсервации, степени ненасыщенности липидов и температуры начала фазового перехода липидов представляли в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm \text{SEM}$). Различия по этим параметрам между группами сравнивали с помощью t-критерия Стьюдента. Данные по индексу фрагментации ядер после криоконсервации и интенсивности флуоресценции липидов (по числу фотонов) представлены в виде медианы и 25–75%-х квартилей – Me [Q1; Q3]. В этих случаях сравнения проводили по U-критерию Манна – Уитни. Различия при

$p < 0.05$ считали статистически значимыми. Для создания графиков использовали пакеты OriginPro (OriginLab Corporation, США) и Biorender (<https://www.biorender.com>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование эмбрионов in vitro с добавлением стеариновой кислоты

Добавление в культуральную среду 400 мкМ СК не влияло ни на скорость развития эмбрионов, ни на индекс фрагментации ядер (табл. 1).

Статистический анализ не выявил достоверных различий по числу интерфазных ядер в эмбрионах через 66 ч культивирования *in vitro* между СК-группой и контролем (табл. 2, рис. 2).

Анализ фазового перехода липидов и степени их ненасыщенности

Влияние СК на степень ненасыщенности липидов и T^* показано на рис. 3.

Степень ненасыщенности внутриклеточных липидов составила $I_{\text{C=C}}/I_{\text{CH}} = 0.96 \pm 0.03$, а $T^* = 1.6 \pm 0.8^\circ\text{C}$ для эмбрионов, культивируемых без ЖК. Добавление 400 мкМ СК в культуральную среду приводило к достоверному снижению ($p < 0.05$) степени ненасыщенности липидов ($I_{\text{C=C}}/I_{\text{CH}} = 0.74 \pm 0.07$) по сравнению с контролем; и достоверному увеличению T^* ($p < 0.001$) более чем на 20°C по сравнению с контролем. Измерения спектров проводили при температуре 25°C и ниже. Точное значение T^* не оценивали, поскольку даже при комнатной температуре фракция липидов

Таблица 1. Влияние стеариновой кислоты (СК) при культивировании *in vitro* на развитие эмбрионов домашней кошки (*Felis silvestris catus*) и фрагментацию ядер до криоконсервации

Параметры	Группы ¹	
	Контроль	СК
Число эмбрионов	17	19
Неразвивающиеся (%)	0 (0)	1 (5.3)
Дробящиеся (%)	1 (5.9)	0 (0)
Ранние морулы (%)	13 (76.5)	15 (78.9)
Поздние морулы (%)	3 (17.6)	3 (15.8)
ИФ ²	5.6 ± 1.3	6.9 ± 1.5

Примечание. ¹Общее число использованных самок – 49. Число повторов – пять. Эмбрионы были случайным образом распределены между группами.

²Данные по индексу фрагментации (ИФ) представлены в виде $M \pm \text{SEM}$ для эмбрионов контрольной и СК-группы ($n = 16$ и $n = 18$ соответственно).

Таблица 2. Влияние стеариновой кислоты (СК) при культивировании *in vitro* на развитие эмбрионов домашней кошки (*Felis silvestris catus*) до и после криоконсервации

Группы	Число ядер до криоконсервации, культивирование <i>in vitro</i> – 66 ч					
	Ранние морулы			Поздние морулы		
	Число эмбрионов	ОЯ	ИЯ	Число эмбрионов	ОЯ	ИЯ
Контроль	13	38.2 ± 2.4	35.0 ± 2.5	3	62.0 ± 3.5	56.7 ± 3.8
СК	15	36.1 ± 2.2	33.1 ± 2.3	3	66.0 ± 6.0	59.7 ± 3.3
Число ядер после криоконсервации, культивирование <i>in vitro</i> – 96 ч						
Контроль	4	38.8 ± 4.1	22.3 ± 9.1	13	80.6 ± 3.5	58.9 ± 5.1
СК	8	36.5 ± 4.0	2.5 ± 1.4*	4	54.3 ± 0.8**	3.5 ± 1.3***

Примечание. Данные представлены как М ± SEM.

ОЯ – общее число ядер; ИЯ – интерфазные ядра.

p* < 0.05; *p* < 0.01; ****p* < 0.001 по сравнению с контролем.

находилась в конформационно-упорядоченном состоянии. Таким образом, воздействие СК на эмбрионы кошек *in vitro* снижало степень ненасыщенности липидов и повышало *T**.

Оценка содержания внутриклеточных липидов

Культивирование *in vitro* в течение 66 ч с добавлением в питательную среду 400 мкМ СК не влияло на общее количество липидов в эмбрионах домашних кошек (рис. 4).

Интенсивность флуоресценции, измеренная как число фотонов, не отличалась между контрольной – $6.4 \cdot 10^6$ [$5.5 \cdot 10^6$; $7.3 \cdot 10^6$] и СК-группой – $5.6 \cdot 10^6$ [$5.2 \cdot 10^6$; $6.1 \cdot 10^6$].

Жизнеспособность эмбрионов после криоконсервации

Добавление в питательную среду 400 мкМ СК оказывало влияние (*p* < 0.05) на развитие эмбрионов после их криоконсервации и дополнительного культивирования *in vitro* в течение 30 ч (табл. 2, 3). Доля ранних морул была выше (*p* < 0.05), тогда как доля эмбрионов на стадии поздних морул была ниже (*p* < 0.05) в СК-группе по сравнению с контролем, что свидетельствует об угнетающем влиянии СК на развитие эмбрионов. Общее число ядер в ранних морулах этих групп не различалось (табл. 2). Однако число интерфазных ядер в ранних морулах СК-группы было меньше (*p* < 0.05) по сравнению с контролем (табл. 2). Общее число ядер (*p* < 0.01), а также число интерфазных ядер (*p* < 0.001) в поздних морулах СК-группы было меньше, чем в контроле (табл. 2, рис. 5).

Кроме того, большинство ядер (97.7%) были фрагментированы в СК-группе, а индекс фрагментации был значительно выше (*p* < 0.001) в этой группе по сравнению с контролем (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании было измерено общее количество внутриклеточных липидов в эмбрионах домашних кошек, однако различий между контрольной и СК-группой установлено не было. В нашей предыдущей работе, как и в данном исследовании, нами не было обнаружено изменений общего количества внутриклеточных липидов в эмбрионах домашних кошек после их культивирования *in vitro* с добавлением другой жирной кислоты, а именно ненасыщенной линолевой кислоты (Окотруб и др., 2022). Ранее другими авторами было показано, что содержание нейтральных липидов в ооцитах мышей было выше после витрификации и отогрева с применением среды, содержащей 1% липидный концентрат, в который входила СК (Ohata *et al.*, 2021). Мы предполагаем, что наблюдаемое в нашем исследовании отсутствие различий по общему количеству внутриклеточных липидов в преимплантационных эмбрионах домашней кошки после воздействия *in vitro* СК может быть вызвано изначально высоким содержанием липидов в ооцитах и эмбрионах данного вида млекопитающих (Galiguis *et al.*, 2014; Amstislavsky *et al.*, 2019). Непрозрачность эмбрионов, связанная с интенсивным рассеянием света на липидных гранулах, затрудняет объемную интеграцию флуоресцентного сигнала после окрашивания нильским красным, в отличие от гораздо более прозрачных эмбрионов мыши, содержащих меньше внутриклеточных липидов (Amstislavsky *et al.*, 2019; Igonina *et al.*, 2021). Между тем воздействие *in vitro* в дозе 25 мкМ СК на преимплантационные эмбрионы крупного рогатого скота в течение пяти дней приводило к снижению общего количества внутриклеточных липидов (Aardema *et al.*, 2022). Следует отметить, что в данном исследовании на крупном рогатом скоте использовали окрашивание флуорохромом LD540,

тогда как в нашем исследовании эмбрионов кошек мы использовали нильский красный. Эти методические различия, а также видовая специфика могли быть причиной того, что выводы, полученные в нашей работе и в исследовании Аардерма с соавторами (Aardema *et al.*, 2022), различаются.

Несмотря на то что в настоящем исследовании мы не обнаружили изменений по общему количеству внутриклеточных липидов после воздействия СК *in vitro*, были выявлены изменения в степени их ненасыщенности и T^* , что свидетельствует о проникновении СК в клетки преимплантационных эмбрионов домашней кошки. Полученные в данной работе результаты хорошо согласуются с нашим предыдущим исследованием, в котором было показано, что воздействие на ооциты домашней кошки в дозах 50–400 мкМ СК в течение 23–45 ч их созревания *in vitro* было достаточным для насыщения клеток данной ЖК (Ranneva *et al.*, 2020). При этом молекулы СК проникли во все липидные гранулы клеток. Интересно отметить, что насыщенная СК снижала степень ненасыщенности внутриклеточных липидов эмбрионов кошки, а воздействие ненасыщенной ЛК в аналогичных условиях приводило к обратному эффекту (Око-труб и др., 2022).

В настоящем исследовании при использовании СК в дозе 400 мкМ не было обнаружено ее влияния на скорость развития эмбриона, число бластомеров и индекс фрагментации ядер при культивировании *in vitro* без криоконсервации. Мы полагаем, что доза, использованная в нашем исследовании, а также продолжительность воздействия кислоты являются оптимальными для эмбрионов домашних кошек, и это послужило причиной того, что скорость развития *in vitro* эмбрионов до криоконсервации не снижалась, несмотря на признаки проникновения СК внутрь клеток. В других работах оценивали влияние СК на скорость развития эмбрионов разных видов млекопитающих (Nonogaki *et al.*, 1994; Van Hoesck *et al.*, 2011; Pawlak *et al.*, 2020; Aardema *et al.*, 2022). По литературным данным, СК в дозе 75 мкМ подавляла развитие *in vitro* эмбрионов крупного рогатого скота; в частности, было обнаружено меньше клеток в бластоцистах и повышение в них уровня апоптоза (Van Hoesck *et al.*, 2011), хотя дозировка 25 мкМ не вызвала подобных изменений (Aardema *et al.*, 2022). У мышей при использовании доз 200–300 мкМ темпы развития эмбрионов *in vitro* существенно замедлялись (Nonogaki *et al.*, 1994). Было показано, что воздействие на ооциты свиньи 150 мкМ СК во время созревания *in vitro* не влияет на последующее развитие полученных из них эмбрионов (Pawlak *et al.*, 2020). В совокупности эти исследования показывают, что СК по-разному влияет на развитие эмбрионов разных видов млекопитающих, эффекты её воздействия зависят от используемой

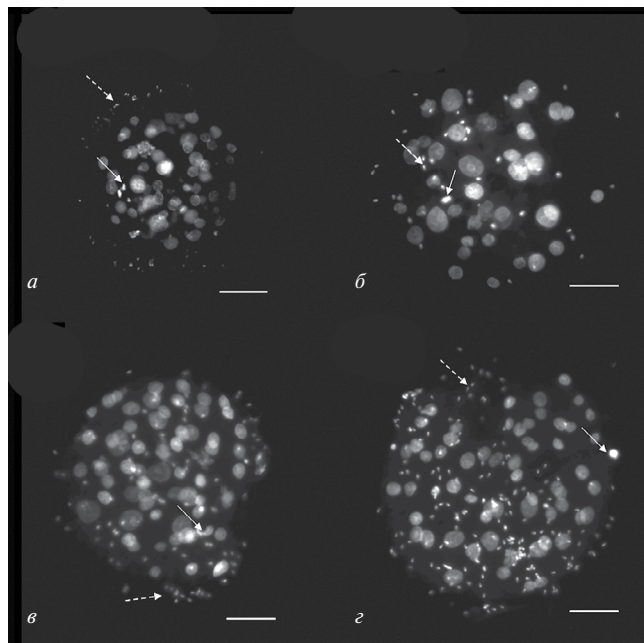


Рис. 2. Стадии развития эмбрионов домашней кошки (*Felis silvestris catus*) после 66 ч культивирования *in vitro* без (а, в) или со стеариновой кислотой –СК (г, д): ранние морулы (а, б) и поздние морулы (г, д); окрашивание DAPI и флуоресцентная микроскопия. Белые стрелки – фрагментации, стрелки пунктиром – сперматозоиды. Шкала – 50 мкм.

дозы и видовой специфики исследуемого объекта (Nonogaki *et al.*, 1994; Van Hoesck *et al.*, 2011; Pawlak *et al.*, 2020; Aardema *et al.*, 2022).

В нашем исследовании установлено, что T^* у эмбрионов после воздействия СК достоверно увеличивается. Это наблюдение находится в полном соответствии с гипотезой о том, что не только общее количество внутриклеточных липидов, но и их качественный состав может быть одним из ключевых факторов, влияющих на криоустойчивость ооцитов и преимплантационных эмбрионов (Amstislavsky *et al.*, 2019). Ранее было показано, что качественный и количественный состав ЖК в ооцитах и преимплантационных эмбрионах специфичен для разных видов млекопитающих (Amstislavsky *et al.*, 2019). Более того, в исследовании на людях было показано, что ооциты и эмбрионы высокого качества содержат больше ненасыщенных ЖК и меньше насыщенных ЖК по сравнению с ооцитами и эмбрионами более низкого качества (Haggarty *et al.*, 2006). Настоящее исследование показывает, что воздействие СК во время культивирования *in vitro* изменяет состав внутриклеточных липидов в сторону их большей насыщенности, что может повлиять на эффективность криоконсервации эмбрионов. Этот результат хорошо согласуется с нашими недавно опубликованными

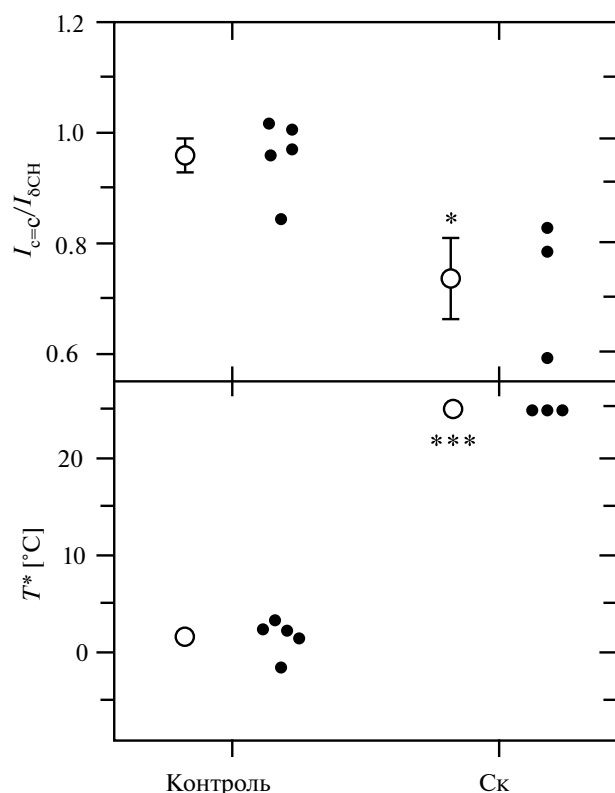


Рис. 3. Влияние стеариновой кислоты (СК) на степень ненасыщенности липидов (вверху) и T^* (внизу) в клетках преимплантационных эмбрионов домашней кошки (*Felis silvestris catus*). Данные представлены как $M \pm SEM$. Каждая точка соответствует одному эмбриону. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем.

наблюдениями о более высокой степени ненасыщенности внутриклеточных липидов и улучшении эффективности криоконсервации эмбрионов домашних кошек после обратного воздействия — их культивирования *in vitro* с ненасыщенной ЛК (Окотруб и др., 2022).

В нашем исследовании СК действительно негативно повлияла на эффективность криоконсервации эмбрионов домашней кошки. Данный результат согласуется с более ранней работой, в которой показано, что дозревание *in vitro* ооцитов крупного рогатого скота с добавлением СК и последующее их оплодотворение приводило к получению blastocyst низкого качества с повышенной криочувствительностью (Shehab-El-Deen *et al.*, 2009). В более поздней работе подтвердили, что культивирование *in vitro* эмбрионов крупного рогатого скота в течение пяти дней в среде с добавлением СК также значительно снижало их криоустойчивость (Aardema *et al.*, 2022). Одним из признаков разрушения эмбриона является наличие ядерных фрагментов, которые обусловлены клеточным

апоптозом (Cecchele *et al.*, 2022). В нашем исследовании индекс фрагментации ядер эмбрионов, подвергшихся воздействию СК в процессе культивирования *in vitro*, был значительно выше по сравнению с контролем после криоконсервации. Наблюдали практически полную гибель всех оттаянных эмбрионов, культивированных *in vitro* в присутствии СК в течение 66 ч до криоконсервации. Такой негативный эффект можно объяснить тем, что после накопления эмбриональными клетками насыщенных ЖК значительно возрастает T^* . Высокая температура начала фазового перехода внутриклеточных липидов рассматривается как фактор повреждения клеток при их охлаждении ниже физиологического оптимума, но выше точки заморозания (Zeron *et al.*, 2002; Amstislavsky *et al.*, 2019). Согласно данным, полученным с помощью спектроскопии КРС, в процессе замораживания насыщенные ЖК в упорядоченной фазе имеют тенденцию распределяться на периферии липидных гранул (Okotrub *et al.*, 2021). Гипотетически избыточное распределение упорядоченных липидов вблизи поверхности ЛГ может влиять на фазовое состояние и функциональные свойства поверхностного монослоя, окружающего ядро ЛГ, поскольку ненасыщенные липиды остаются заключенными в центре данных структур и не имеют доступа к периферии (Okotrub *et al.*, 2021). Более того, после оттаивания клеток до физиологических температур некоторые насыщенные липиды остаются в упорядоченном конформационном состоянии (Okotrub *et al.*, 2021), что, вероятно, оказывает пагубное влияние на дальнейшее развитие эмбрионов. Если предположить, что в норме при физиологических температурах внутриклеточные липиды должны находиться в неупорядоченном фазовом состоянии для участия в биологических процессах, то молекулы в упорядоченном конформационном состоянии в физиологических условиях могут эти процессы нарушать.

Возможно, воздействие ЖК *in vitro* также может влиять на преимплантационные эмбрионы через эпигенетические механизмы. Существует предположение, что воздействие различных ЖК *in vitro* может влиять на уровень экспрессии генов и метилирования ДНК в ооцитах, в клетках кумулюса и преимплантационных эмбрионов (Desmet *et al.*, 2016; Barrera *et al.*, 2018; Pawlak *et al.*, 2020; Ohata *et al.*, 2021). В частности, культивирование *in vitro* эмбрионов в среде с добавлением смеси 425 мкМ неэтерифицированных ЖК, содержащей 75 мкМ СК, 150 мкМ ПК и 200 мкМ ОК, приводило к изменению метилирования ДНК в клетках 7.5-дневных blastocyst крупного рогатого скота (Desmet *et al.*, 2016). Использование раствора для отогрева, содержащего 1% липидный концентрат, в том числе СК, приводило к повышению экспрессии генов *Acaa2* и *Hadha* у эмбрионов мышей (Ohata *et al.*, 2021).

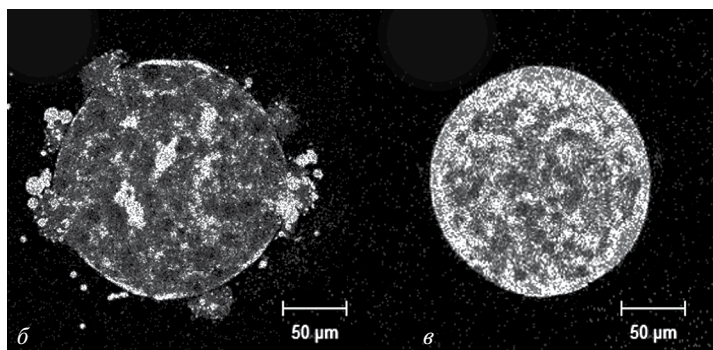
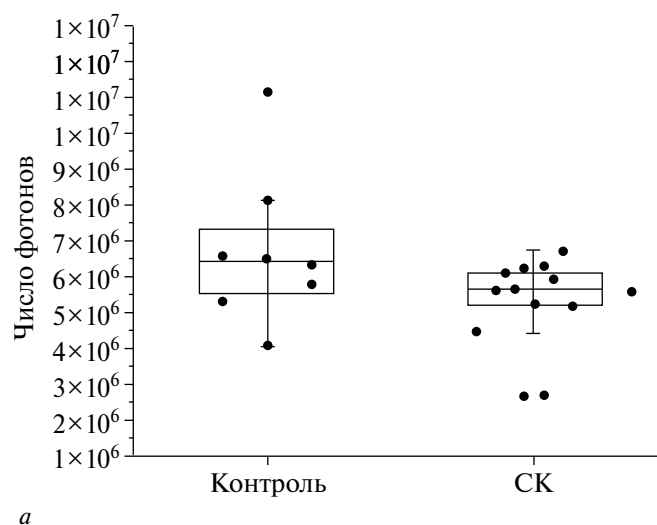


Рис. 4. Интенсивность флуоресценции эмбрионов домашней кошки (*Felis silvestris catus*), окрашенных нильским красным, через 66 ч культивирования *in vitro* без и со стеариновой кислотой (СК). а – число фотонов (Me [Q1; Q3]), каждая точка соответствует одному эмбриону; б, в – репрезентативные оптические срезы КЛСМ эмбрионов домашней кошки, окрашенных нильским красным. б – без СК; в – с СК. Шкала – 50 мкм.

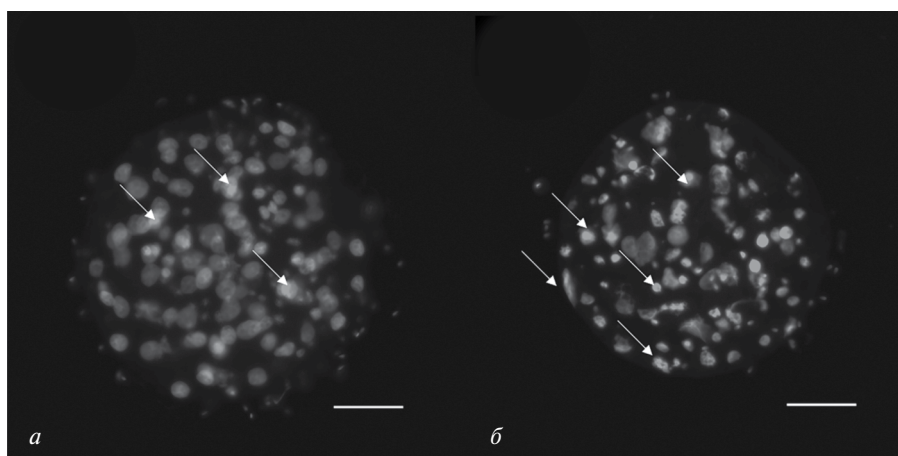


Рис. 5. Поздние морулы домашней кошки (*Felis silvestris catus*) после замораживания-оттаивания и последующего культивирования *in vitro* в течение 30 ч (общее время – 96 ч): контрольная (а) и СК (б) группы; окрашивание DAPI. Стрелки указывают на фрагментированные ядра. Шкала – 50 мкм.

Таблица 3. Влияние стеариновой кислоты (СК) при культивировании *in vitro* на развитие эмбрионов домашней кошки (*Felis silvestris catus*) и фрагментацию ядер после криоконсервации

Параметры	Группы ¹	
	Контроль	СК
Число эмбрионов	18	13
Неразвивающиеся (%)	1 (5.6)	0 (0)
Дробящиеся (%)	0 (0)	1 (7.7)
Морулы (%)	4 (22.2)	8 (61.5)*
Поздние морулы (%)	13 (72)	4 (30.7)*
ИФ ²	23.8 [12; 42.9]	97.7 [90.6; 100]***

Примечание. ¹Общее число использованных самок – 49. Число повторов – пять. Эмбрионы были случайным образом распределены между группами.
²Данные по индексу фрагментации (ИФ) представлены в виде Ме [Q1; Q3] для эмбрионов контрольной и СК-группы (n = 17 и n = 12 соответственно).
p* < 0.05; **p* < 0.001 по сравнению с контролем.

Кроме того, в ооцитах овец, которые дозревали *in vitro* в среде с добавлением делипидированной сыворотки и затем витрифицировали, наблюдали повышенную экспрессию маркеров стресса эндоплазматического ретикулума: генов *Atf4*, *Atf6*, *Grp78* и *Chop10*; эти изменения могут влиять и на метаболизм липидов (Barrera *et al.*, 2018). Экспрессия генов *Acaca*, *Scd*, *Plin2*, *Fads1* и *Fads2* повышалась в кумулюсных клетках и ооцитах свиньи после воздействия ЖК (Pawlak *et al.*, 2020). Можно предположить, что воздействие СК на преимплантационные эмбрионы кошек *in vitro* вызывает изменения в экспрессии генов, связанных с криочувствительностью клеток, что может приводить к низкой криоустойчивости эмбрионов после воздействия СК.

Ранее с помощью спектроскопии КРС было установлено, что добавление ненасыщенной ЛК в культуральную среду приводит к увеличению степени ненасыщенности липидов в преимплантационных эмбрионах домашней кошки (Окотруб и др., 2022). Эти изменения приводили к снижению *T**, что положительно отражалось на криоустойчивости эмбрионов (Окотруб и др., 2022). Напротив, как показало представляемое в данной статье исследование, добавление в культуральную среду насыщенной СК приводит к значительному снижению степени ненасыщенности липидов без изменения общего их содержания, что в свою очередь, в полном соответствии с нашей гипотезой, приводит к увеличению *T** и, следовательно, к низкой эффективности криоконсервации эмбрионов. Таким образом, настоящее исследование вместе

с нашим предыдущим результатом (Окотруб и др., 2022) подтверждают гипотезу о том, что степень ненасыщенности внутриклеточных липидов играет важную роль в криочувствительности эмбрионов домашних кошек.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши результаты свидетельствуют о том, что культивирование *in vitro* эмбрионов домашней кошки с добавлением стеариновой кислоты привело к уменьшению степени ненасыщенности внутриклеточных липидов, но не повлияло на их общее количество и скорость развития эмбрионов до криоконсервации. Тем не менее снижение степени ненасыщенности липидов привело к значительному увеличению температуры начала фазового перехода липидов и подавлению последующего развития эмбрионов *in vitro* после криоконсервации. Вместе с нашими более ранними результатами по воздействию *in vitro* ненасыщенной линолевой кислоты на эмбрионы домашних кошек эта работа демонстрирует роль липидного состава в криотолерантности эмбрионов домашней кошки и подтверждает взаимосвязь между *T**, степенью ненасыщенности липидов и эффективностью криоконсервации. Эти результаты важны для выбора способа сохранения генетических ресурсов тех видов млекопитающих, ооциты и эмбрионы которых отличаются высоким содержанием внутриклеточных липидов. Речь идет о некоторых сельскохозяйственных животных, в частности о свиньях, а также о представителях отряда хищных, к которому относятся редкие и исчезающие виды кошачьих.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке РНФ № 21-74-10108 с использованием оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023). Микроскопические работы выполнены в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

ЭТИЧЕСКОЕ ОДОБРЕНИЕ

Все исследования проводились в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и другие научные цели (СЭД № 123). Исследование одобрено Комитетом по биоэтике (протокол № 144 от 29 марта 2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Амстиславский С.Я., Мокроусова В.И., Кожевникова В.В., Кизилова Е.А., Брусенцев Е.Ю., Окотруб К.А., Напимеров В.А., Найдено С.В. Криобанк генетических ресурсов кошачьих // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21. № 5. С. 561–568.
<https://doi.org/10.18699/10.18699/VJ17.27-0>
- Окотруб С.В., Лебедева Д.А., Окотруб К.А., Чуйко Э.А., Брусенцев Е.Ю., Рахманова Т.А., Амстиславский С.Я. Влияние линолевой кислоты на криоконсервацию полученных путем ЭКО эмбрионов домашней кошки // Онтогенез. 2022. Т. 53. № 5. С. 345–357.
<https://doi.org/10.31857/S0475145022050068>
- Aardema H., Bertijn I., van Tol H., Rijnveld A., Vernooij J., Gadella B.M., Vos P. Fatty acid supplementation during in vitro embryo production determines cryosurvival characteristics of bovine blastocysts // Front. Cell. Dev. Biol. 2022. V. 10. P. 837405.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2022.837405>
- Abe H., Yamashita S., Satoh T., Hoshi H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media // Mol. Reprod. Dev. 2002. V. 61. P. 57–66.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1131>
- Amstislavsky S., Mokrousova V., Brusentsev E., Okotrub K., Comizzoli P. Influence of cellular lipids on cryopreservation of mammalian oocytes and preimplantation embryos: a review // Biopreserv. Biobanking. 2019. V. 17. P. 76–83.
<https://doi.org/10.1089/bio.2018.0039>
- Amstislavsky S., Brusentsev E., Kizilova E., Mokrousova V., Kozhevnikova V., Abramova T., Rozhkova I., Naidenko S. Sperm cryopreservation in the Far-Eastern wildcat (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) // Reprod. Domest. Anim. 2018. V. 53. P. 1219–1226.
<https://doi.org/10.1111/rda.13230>
- Barrera N., Dos Santos Neto P.C., Cuadro F., Bosolasco D., Mulet A.P., Crispo M., Menchaca A. Impact of delipidated estrous sheep serum supplementation on in vitro maturation, cryotolerance and endoplasmic reticulum stress gene expression of sheep oocytes // PLoS One. 2018. V. 13. e0198742.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198742>
- Borges E., Vireque A. Updating the impact of lipid metabolism modulation and lipidomic profiling on oocyte cryopreservation // EMJ. 2019. V. 4. P. 79–87.
<https://doi.org/10.33590/emj/10310074>
- Brusentsev E., Kizilova E., Mokrousova V., Kozhevnikova V., Rozhkova I., Amstislavsky S. Characteristics and fertility of domestic cat epididymal spermatozoa cryopreserved with two different freezing media // Theriogenology. 2018. V. 110. P. 148–152.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.038>
- Cecchele A., Cermisoni G., Giacomini E., Pinna M., Viganò P. Cellular and molecular nature of fragmentation of human embryos // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 1349.
<https://doi.org/10.3390/ijms23031349>
- Crichton E., Bedows E., Miller-Lindholm A., Baldwin D.M., Armstrong D.L., Graham L.H., Ford J.J., Gjørret J.O., Hyttel P., Pope C.E., Vajta G., Loskut-off N.M. Efficacy of porcine gonadotropins for repeated stimulation of ovarian activity for oocyte retrieval and in vitro embryo production and cryopreservation in Siberian tigers (*Panthera tigris altaica*) // Biol. Reprod. 2003. V. 68. P. 105–113.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.101.002204>
- Desmet K.L., van Hoeck V., Gagne D., Fournier E., Thakur A., O'Doherty A.M., Walsh C.P., Sirard M.A., Bols P.E., Leroy J.L. Exposure of bovine oocytes and embryos to elevated non-esterified fatty acid concentrations: integration of epigenetic and transcriptomic signatures in resultant blastocysts // BMC Genomics. 2016. V. 17. P. 1004.
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-3366-y>
- Fayezi S., Leroy J., Ghaffari Novin M., Darabi M. Oleic acid in the modulation of oocyte and preimplantation embryo development // Zygote. 2018. V. 26. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1017/S0967199417000582>
- Galiguis J., Gomez M., Leibo S., Pope C. Birth of a domestic cat kitten produced by vitrification of lipid polarized in vitro matured oocytes // Cryobiology. 2014. V. 68. P. 459–466.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.02.012>
- Genicot G., Leroy J., van Soom A., Donnay I. The use of a fluorescent dye Nile red to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes // Theriogenology. 2005. V. 63. P. 1181–1194.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00556.x>
- Haggarty P., Wood M., Ferguson E., Hoad G., Srikantharajah A., Milne E., Hamilton M., Bhattacharya S. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos // Hum. Reprod. 2006. V. 21. P. 766–773.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dei385>
- Idrissi S., Bourhis D., Lefevre A., Emond P., Le Berre L., Desnoes O., Joly T., Buff S., Maillard V., Schibler L., Salvetti P., Elis S. Lipid profile of bovine grade-1 blastocysts produced either in vivo or in vitro before and after slow freezing process // Sci. Rep. 2021. V. 11. P. 11618.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-90870-8>
- Igonina T., Okotrub K., Brusentsev E., Chuyko E.A., Ragayeva D.S., Ranneva S.V., Amstislavsky S.Y. Alteration of the lipid phase transition during mouse embryos freezing after in vitro culture with linoleic acid // Cryobiology. 2021. V. 99. P. 55–63.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.01.014>
- IUCN Red List of Threatened Species // IUCN. 2021. [Электронный ресурс]. <https://www.iucnredlist.org/search?taxonomies=101738&searchType=species>
- Kochan J., Nowak A., Młodawska W., Prochowska S., Partyka A., Skotnicki J., Nizanski W. Comparison of the morphology and developmental potential of oocytes

- obtained from prepubertal and adult domestic and wild cats // *Animals*. 2021. V. 11. P. 20.
<https://doi.org/10.3390/ani11010020>
- Karasahin T. The effect of oleic and linoleic acid addition to the culture media on bovine embryonic development following vitrification // *Pol. J. Vet. Sci.* 2019. V. 22. P. 661–666.
<https://doi.org/10.24425/pjvs.2019.129978>
- Lawson E.F., Grupen C.G., Baker M.A., Aitken R.J., Swegen A., Pollard C.L., Gibb Z. Conception and early pregnancy in the mare: lipidomics the unexplored frontier // *Reprod. Fertil.* 2022. V. 3. R1–R18.
<https://doi.org/10.1530/RAF-21-0104>
- Mazur P. Equilibrium, quasiequilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos // *Cell. Biophys.* 1990. V. 17. P. 53–92.
<https://doi.org/10.1007/BF02989804>
- Mokrousova V., Okotrub K., Amstislavsky S., Surovtsev N. Raman spectroscopy evidence of lipid separation in domestic cat oocytes during freezing // *Cryobiology*. 2020a. V. 95. P. 177–182.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.03.005>
- Mokrousova V., Okotrub K., Brusentsev E., Kizilova E.A., Surovtsev N.V., Amstislavsky S.Y. Effects of slow freezing and vitrification on embryo development in domestic cat // *Reprod. Dom. Anim.* 2020b. V. 55. P. 1328–1336.
<https://doi.org/10.1111/rda.13776>
- Nagashima H., Kashiwazaki N., Ashman R., Grupen C.G., Nottle M.B. Cryopreservation of porcine embryos // *Nature*. 1995. V. 374. P. 416.
<https://doi.org/10.1038/374416a0>
- Nonogaki T., Noda Y., Goto Y., Kishi J., Mori T. Developmental blockage of mouse embryos caused by fatty acids // *J. Assist. Reprod. Genet.* 1994. V. 11. P. 482–488.
<https://doi.org/10.1007/BF02215713>
- Ohata K., Ezoe K., Miki T., Kouraba S., Fujiwara N., Yabuuchi A., Kobayashi T., Kato K. Effects of fatty acid supplementation during vitrification and warming on the developmental competence of mouse, bovine and human oocytes and embryos // *Reprod. Biomed. Online*. 2021. V. 43. P. 14–25.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.03.022>
- Okotrub K., Okotrub S., Mokrousova V., Amstislavsky S.Y., Surovtsev N.V. Lipid phase transitions in cat oocytes supplemented with deuterated fatty acids // *Biophys. J.* 2021. V. 120. P. 5619–5630.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.11.008>
- Okotrub K., Mokrousova V., Amstislavsky S., Surovtsev N. Lipid droplet phase transition in freezing cat embryos and oocytes probed by Raman spectroscopy // *Biophys. J.* 2018. V. 115. P. 577–587.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.06.019>
- Pawlak P., Malyszka N., Szczerbal I., Kolodziejewski P. Fatty acid induced lipolysis influences embryo development, gene expression and lipid droplet formation in the porcine cumulus cells // *Biol. Reprod.* 2020. V. 103. P. 36–48.
<https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa045>
- Ranneva S., Okotrub K., Amstislavsky S., Surovtsev N. Deuterated stearic acid uptake and accumulation in lipid droplets of cat oocytes // *Arch. Biochem. Biophys.* 2020. V. 692. P. 108532.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108532>
- Renard J.P., Babinet C. High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1–2 propanediol as cryoprotectant // *J. Exp. Zool.* 1984. V. 230. P. 443–448.
<https://doi.org/10.1002/jez.1402300313>
- Roth T., Swanson W., Wildt D. Developmental competence of domestic cat embryos fertilized in vivo versus in vitro // *Biol. Reprod.* 1994. V. 51. P. 441–451.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod51.3.441>
- Shehab-El-Deen M., Leroy J., Maes D., van Soom A. Cryotolerance of bovine blastocysts is affected by oocyte maturation in media containing palmitic or stearic acid // *Reprod. Domest. Anim.* 2009. V. 44. P. 140–142.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01084.x>
- Swanson W.F., Roth T.L., Wildt D.E. In vivo embryogenesis, embryo migration, and embryonic mortality in the domestic cat // *Biol. Reprod.* 1994. V. 51. P. 452–464.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod51.3.452>
- van Hoeck V., Sturmey R., Bermejo-Alvarez P., Rizos D., Gutierrez-Adan A., Leese H.J., Bols P.E., Leroy J.L. Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology // *PLoS One*. 2011. V. 6. e23183.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023183>
- Yousif M., Calder M., Du J., Ruetz K.N., Crocker K., Urquhart B.L., Betts D.H., Rafea B.A., Watson A.J. Oleic acid counters impaired blastocyst development induced by palmitic acid during mouse preimplantation development: understanding obesity-related declines in fertility // *Reprod. Sci.* 2020. V. 27. P. 2038–2051.
<https://doi.org/10.1007/s43032-020-00223-5>
- Zahmel J., Jansch S., Jewgenow K., Sandgreen D.M., Skalborg Simonsen K., Colombo M. Maturation and fertilization of African lion (*Panthera leo*) oocytes after vitrification // *Cryobiology*. 2021. V. 98. P. 146–151.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.11.011>
- Zeron Y., Sklan D., Arav A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes // *Mol. Reprod. Dev.* 2002. V. 61. P. 271–278.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1156>

Effects of Stearic Acid on the Cryotolerance of the Domestic Cat (*Felis silvestris catus*) Embryos

E. Yu. Brusentsev¹, S. V. Okotrub¹, D. A. Lebedeva^{1, 2, 3}, K. A. Okotrub²,
T. A. Rakhmanova^{1, 2, 3}, S. Ya. Amstislavsky^{1, 2, #}

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
prosp. Lavrentyeva 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Institute of Automation and Electrometry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
prosp. Koptiyuga 1, Novosibirsk, 630090 Russia*

³*Novosibirsk State University, Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia*

[#] *e-mail: amstis@yandex.ru*

The current work aimed to study the effect of domestic cat (*Felis silvestris catus*) embryos *in vitro* exposure to saturated stearic acid (SA) and to evaluate how the change in lipid content affects the cryopreservation results. The addition of SA to the culture medium did not affect the development of cat embryos *in vitro* before cryopreservation. The total lipid amount in the SA-treated embryos was not changed as well. However, the lipid unsaturation degree was lower in embryos after *in vitro* exposure to SA. Moreover, the lipid phase transition onset temperature (T^*) was higher in SA-treated embryos as compared with controls. These changes of intracellular lipids unsaturation degree and T^* were associated with the impairment of embryo cryopreservation effectiveness. The results obtained may be of importance for the applying Genome Resource Banking concept to the Felinae species.

Keywords: Felidae; *in vitro* fertilization; early development; *in vitro* culture; intracellular lipids; fatty acids; program freezing; Raman spectroscopy

ВНЕБРАЧНЫЕ ПОТОМКИ У ПЕНОЧКИ-ТРЕЩОТКИ (*PHYLLOSCOPUS SIBILATRIX*) В ЦЕНТРАЛЬНОЙ РОССИИ

© 2024 г. М. Я. Горецкая*, @, Ю. С. Белоконов**, М. М. Белоконов**

*Звенигородская биологическая станция, биологический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия

**Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук, ул. Губкина, д. 3, Москва, 119991 Россия

@E-mail: m.goretskaia@gmail.com

Поступила в редакцию 17.01.2023 г.

После доработки 02.03.2023 г.

Принята к публикации 05.03.2023 г.

У воробьиных птиц довольно широко распространены случаи внебрачного отцовства, до 50%. Количество внебрачных потомков (ЕРУ) варьирует у разных видов и популяций одного и того же вида. Мы исследовали встречаемость ЕРУ у пеночки-трещотки (*Phylloscopus sibilatrix*) — птицы с политерриториальным поведением. Результаты основаны на анализе генотипов птиц по семи ядерным микросателлитным локусам. ЕРУ были обнаружены в 41% гнезд, 16 из 39. Встречаемость ЕРУ составила 25%, т.е. 52 из 212 птенцов. Мы не обнаружили связи между родством внутри пары и наличием ЕРУ, также не было выявлено разницы в гетерозиготности и массе тела между ЕРУ и птенцами, принадлежащими социальному отцу (WPU). Обсуждаются возможные причины возникновения внебрачных отношений.

Ключевые слова: внебрачное отцовство, масса тела, генетическое сходство внутри пары, гетерозиготность, микросателлиты, пеночка-трещотка

DOI: 10.31857/S1026347024010096, **EDN:** LNNAMD

Внебрачное отцовство широко распространено среди воробьиных птиц (50–60%) (Petrie, Kempnaers, 1998; Griffith *et al.*, 2002). Количество внебрачных потомков (extra pair young, ЕРУ) довольно сильно варьирует у разных видов и популяций одного и того же вида. Например, у мухоловки-пеструшки *Ficedula hypoleuca* доля ЕРУ меняется от 4% в норвежской до 24% в шведской популяции (Gelter, Tegelstrom, 1992). Некоторые виды, например лесная завирушка *Prunella moduleis*, реализуют различные стратегии спаривания, от социальной моногамии до социальной полиандрии, с разной долей внебрачных потомков в каждом из случаев (Santos *et al.*, 2015).

Самцы, как правило, получают выгоду от внебрачных копуляций (extra pair copulation, ЕРС), увеличивая количество своего потомства, то есть повышая свой репродуктивный успех. Причины участия в них самок до сих пор до конца не понятны (Griffith *et al.*, 2002; Akçay, Roughgarden, 2007; Griffith, Immler, 2009). Так, самки социально-моногомных видов обычно не получают прямой выгоды от ЕРС (Griffith *et al.*, 2002), а риски, связанные с ними, могут перевешивать гипотетический

генетический успех. Участие в ЕРС может привести к снижению родительской заботы социального отца (Albrecht *et al.*, 2006) или повышенному риску передачи заболеваний (Forstmeier *et al.*, 2014). Предполагают, что самки могут получать косвенные выгоды от внебрачного отцовства (extra pair paternity, ЕРР), так, были предложены несколько объяснений, как правило, дополняющих друг друга. Гипотеза “хороших генов” (Good genes) основывается на том, что самка может выбирать самца на основе показателей, отражающих его хорошее физиологическое состояние, таких как иммунный статус, уровень инвазии паразитов и т.д. (Hasselquist *et al.*, 1996; Kempnaers *et al.*, 1997; Foerster *et al.*, 2003; Møller *et al.*, 2003). Предполагается, что здоровый партнер может передать “хорошие” гены, что приводит к высокой степени выживаемости птенцов. Другая теория предполагает, что самка ищет совместимые гены, чтобы получить неаддитивные генетические преимущества в сочетании материнских и отцовских аллелей (Jennions, Petrie, 2000; Tegenza, Wedell, 2000; Neff, Pitcher, 2005). Частным случаем этой гипотезы является избегание размножения с близкими родственниками. Следовательно, самка в паре с родственным самцом может

с большей вероятностью вступать в ЕРС с другим самцом, обладающим генотипом, наиболее отличающимся от ее собственного, чтобы увеличить генетическое разнообразие и выживаемость своих потомков. Таким образом будет увеличена индивидуальная гетерозиготность ее птенцов. Высокая гетерозиготность снижает риск экспрессии рецессивных вредных аллелей и предотвращает другие негативные эффекты инбридинга, которые могут привести к снижению приспособленности (Keller, Waller, 2002). С другой стороны, существуют “неадаптивные” модели, объясняющие участие самок во внебрачных копуляциях, в них предполагается, что ЕРС может быть побочным продуктом отбора, влияющего на поведение самцов (Forstmeier *et al.*, 2014; Hsu *et al.*, 2015; Nakagawa *et al.*, 2015; Brouwer *et al.*, 2017).

В настоящей работе мы исследовали ЕРУ у мелких воробьиных птиц на примере пеночки-трещотки *Phylloscopus sibilatrix* в Центральной России. В этом исследовании мы проверяли частный случай гипотезы о совместимости генов, а именно: влияет ли степень родства партнеров в паре на уровень гетерозиготности внебрачных и брачных потомков. Если самки пеночки-трещотки участвуют в ЕРС для увеличения генетического разнообразия (гетерозиготности) потомства, то ее ЕРУ должны быть более гетерозиготными, чем WPU (within pair young). В свою очередь самки, более родственные социальному партнеру, должны участвовать в ЕРС чаще, чем неродственные. Также мы тестировали гипотезу “хороших генов”, предполагающую, что качество потомства увеличивается за счет ЕРС. Согласно данной гипотезе ЕРУ должны иметь большую массу тела, чем WPU. Поскольку пол может влиять на выживаемость потомства (Pipoly *et al.*, 2015), мы оценивали пропорцию самцов и самок в каждой из групп.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Полевые наблюдения и сбор образцов. Исследования проводились в лесном массиве на пробной площадке площадью 90 га на Звенигородской биологической станции им С. Н. Скадовского МГУ, Московская область, Россия (55°41'57"N/55.699101, 36°43'23"E/36.722945) в течение 7 лет, с 2009 по 2015 г.

По нашим наблюдениям, пеночка-трещотка приступает к размножению в середине мая. Гнезда располагает на земле. Средний размер кладки составляет 5.5 яиц (от 3 до 7), самцы участия в насиживании не принимают. Инкубационный период длится 12 дней, птенцы обычно покидают гнездо через 12–13 дней после вылупления.

Изучено 66 взрослых особей (35 самцов и 31 самка) и 212 птенцов из 39 гнезд (28 полных семей, в восьми случаях у нас были образцы крови

только социального отца, а в трех случаях — только образцы крови матери). Для анализа старались отлавливать всех поющих самцов на исследуемом участке. Взрослых самцов отлавливали с помощью паутинных сетей на рекламируемых территориях, применяя метод звуковых ловушек (воспроизведения песен консpezifика). Самцов и самок также отлавливали на гнездах. Взрослые птицы были окольцованы, а также индивидуально помечены актерским гримом. За помеченными самцами по возможности наблюдали на протяжении всего периода размножения от рекламирования территорий до выкармливания птенцов. Социальным партнером считали самца, поющего регулярно рядом с гнездом и участвующего хотя бы частично в выкармливании птенцов. Птенцов из гнезд окольцовывали и взвешивали на 6–11-й день после вылупления. Взвешивание проводили с точностью до 0.1 г, используя карманные электронные весы AG532/500. У всех птиц отбирали образцы крови (20–50 мкл) из плечевой вены. Мышцы от погибших птенцов собирали и фиксировали в 70° этаноле.

Генотипирование. Из образцов крови и тканей, зафиксированных в этаноле, выделяли ДНК с помощью наборов Diatom™ DNA Prep 100 (ООО “Лаборатория Изоген”, Россия) согласно прилагаемой инструкции. Пол птенцов определяли, используя праймеры P2 и P8 к участку гена *CHD* (Griffiths *et al.*, 1998). ПЦР-амплификацию проводили с использованием наборов GenePak® PCR Core (0.2 мл) (ООО “Лаборатория Изоген”, Россия). Условия амплификации включали начальную денатурацию при 94 °C в течение 3 мин, затем 35 циклов: 94 °C в течение 30 с, 50 °C в течение 30 с и 72 °C в течение 45 с, с финальной элонгацией при 72 °C в течение 3 мин. Продукты ПЦР разделяли в 2% агарозном геле, окрашивали бромистым этидием и визуализировали в УФ-свете.

Для анализа отцовства мы использовали семь ядерных микросателлитных локусов: *Ase5*, *Ase18* (Richardson *et al.*, 2001); *Fhu2* (Primmer *et al.*, 1996); *Fhy221* (Leder *et al.*, 2008); *Pca3* (Dawson *et al.*, 2000); *POCC5*, *POCC8* (Bensch *et al.*, 1997). Все микросателлиты содержали динуклеотидные повторы, за исключением тетрануклеотидного *Fhy221*. ПЦР-амплификацию проводили с использованием наборов GenePak® PCR Core при условиях, описанных в соответствующих публикациях. Амплифицированные фрагменты разделяли с помощью электрофореза в 6%-м полиакриламидном геле. Длину фрагментов определяли путем сравнения с маркером длин (плазмиды *E. coli* pBR322, обработанная эндонуклеазой рестрикции *HpaII*) в программе Photo-Capt (Vilber Lourmat). На основании полученных данных составляли таблицы многолокусных генотипов для всех особей.

Анализ генотипических данных. Параметры генетического разнообразия популяции для выборки

взрослых птиц (число аллелей, средняя наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготности, соответствие распределения генотипов равновесию Харди – Вайнберга) оценивали при помощи программы GenAlEx 6.5 (Peakall, Smouse, 2006, 2012). Для локусов с отклонением от равновесия Харди – Вайнберга в сторону дефицита гетерозигот частоты нуль-аллелей рассчитывали с помощью программного обеспечения Micro-Checker с использованием методов Брукфилда и Чакраборти (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

Мы рассчитали индивидуальную гетерозиготность (HetZ) (соотношение гетерозиготных локусов к числу исследованных локусов) по шести локусам для всех потомков. Локус *POCC5* был исключен из расчета, поскольку он сцеплен с полом. Самки несут только одну Z-хромосому, и поэтому генотипы по данному локусу не могут быть использованы в подсчете индивидуальной гетерозиготности. Однако мы использовали данный локус при анализе соответствия генотипов родителей и птенцов.

Многолокусные генотипы каждой пары родителей и их потомков анализировали на соответствие, исходя из предположения, что самка, пойманная на гнезде, приходится матерью птенцам в выводке. Отцовство исключали, если генотипы показывали множественные (более чем по одному локусу) несовпадения между потенциальным отцом и потомством. Чтобы определить генотипы потенциальных отцов или матерей в случае неполных семей при наличии генотипа социального партнера, мы использовали программу GERUD2.0 (Jones, 2005). Степень генетического сходства между социальными партнерами (QGM) для 39 пар оценивали, используя алгоритм измерения родства (Queller, Goodnight, 1989), с помощью компьютерной программы GenAlEx 6.5 (Peakall, Smouse, 2006, 2012).

Таблица 1. Параметры генетической изменчивости популяции пеночки-трешотки

Локус	N_a	H_o	H_e	F
<i>Ase5</i>	12	0.742	0.825	0.100
<i>Ase18</i>	21	0.879	0.922	0.047
<i>Fhu2</i>	11	0.667	0.762	0.125
<i>Fhy221</i>	7	0.712	0.718	0.008
<i>Pca3</i>	9	0.833	0.818	–0.018
<i>POCC8</i>	13	0.773	0.859	0.100
В среднем	12.167	0.768	0.817	0.060
(+SE)	(±1.973)	(±0.032)	(±0.029)	(±0.023)

Примечание. N_a – число аллелей в локусе; H_o – средняя наблюдаемая гетерозиготность; H_e – средняя ожидаемая гетерозиготность; F – индекс фиксации.

Статистический анализ. Мы анализировали данные с помощью линейных смешанных моделей (LMM) с функцией lme() в пакете nlme (Pinheiro *et al.*, 2018) в R4.1.2 (R Core Team, 2021), анализ начинали с полной модели.

Поскольку исследуемые выводки были разного возраста, для сравнения всех гнезд мы нормализовали значение массы тела в каждом выводке, используя процедуру нормализации в Excel.

Для выявления связи между индивидуальной гетерозиготностью и отцовством мы использовали два типа анализа. В первом варианте предиктором (фиксированным фактором) было отцовство – свои дети WPY против чужих EPY. Во втором варианте анализа мы разделили птенцов на три группы: 1 – WPY из гнезд без EPY, 2 – WPY из гнезд с EPY, 3 – EPY, в данном случае предиктором была принадлежность к группе. Зависимыми переменными были нормализованная масса тела, индивидуальная гетерозиготность и пол птенца. Все модели включали год наблюдения, гнездо и номер птицы как случайную переменную. Переменные были исключены из дизайна модели в соответствии с протоколом обратного упрощения модели (Zuur *et al.*, 2009), на каждом этапе проверялась нормальность распределения остатков. Для определения связи генетического сходства между партнерами с появлением в выводках EPY, мы применяли коэффициент родства (QGM) в паре как зависимую переменную, отцовство как фиксированный фактор и год наблюдения как случайную переменную в моделях LMM.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генетическая изменчивость. На основании индивидуальных генотипов 66 взрослых птиц были рассчитаны частоты аллелей микросателлитных локусов и получены параметры генетической изменчивости исследуемой популяции (табл. 1).

Среднее число аллелей на локус составило 12.2 (от 7 до 21). Средняя наблюдаемая гетерозиготность выбранных локусов составила 0.768 (от 0.667 до 0.879). Полученные данные свидетельствуют о достаточно высоком генетическом разнообразии выбранных нами локусов и их пригодности для семейного анализа. В локусах *Ase5*, *Fhu2* и *POCC8* обнаружен незначительный дефицит гетерозигот. Проверка этих локусов на наличие в них неамплифицируемых аллелей показала, что в локусе *Ase5* вероятная частота нуль-аллеля от 0.045 до 0.057, в локусе *Fhu2* – от 0.054 до 0.067, а в локусе *POCC8* – от 0.046 до 0.053. Тем не менее при совместном анализе взрослых птиц и выводков мы выявили наличие нуль-аллелей в локусе *Ase5* в трех семьях, в локусе *Fhu2* в двух семьях и не обнаружили нуль-аллелей в локусе *POCC8*.

Встречаемость ЕРҮ. Согласно данным семейного анализа все птенцы принадлежали выкармливающим их матерям. ЕРҮ были обнаружены в 41% гнезд, 16 из 39. Встречаемость ЕРҮ составила 25%, т.е. 52 из 212 птенцов не принадлежали их социальным отцам. Распределение ЕРҮ различалось между выводками.

В четырех выводках были только ЕРҮ, также было обнаружено 12 смешанных выводков и в 23 выводках птенцы принадлежали социальным родителям. Среди всего пула самцов возможный отец ЕРҮ был определен только в одном случае. Это был самец, поющий на территории, прилегающей к территории социального отца. В остальных случаях потенциальных внебрачных отцов выявить не удалось.

При анализе результатов с применением линейных смешанных моделей (LMM) нами не было обнаружено значимой связи между коэффициентом родства (QGM) партнеров в паре и наличием ЕРҮ ($t = -1.51$, $p = 0.14$, $N = 39$), хотя коэффициент родства в парах с ЕРҮ оказался несколько ниже, чем в парах без ЕРҮ.

Различия между ЕРҮ и WРҮ. Нами не выявлено различий в значениях индивидуальной гетерозиготности у WРҮ и ЕРҮ ($t = -0.6$, $p = 0.44$, $N = 212$). Принадлежность к гнездовой группе также не влияла на гетерозиготность птенцов ($t = 0.14$, $p = 0.88$).

Мы не выявили различий в массе тела у WРҮ и ЕРҮ ($t = 0.56$, $p = 0.6$, $N = 212$). Принадлежность к гнездовой группе также не влияла на массу тела птенцов ($t = 0.28$, $p = 0.8$).

Соотношение полов во всем потомстве не отклонялось от распределения 1: 1 (119 самок и 93 самца). Пол не влиял на гетерозиготность и массу тела WРҮ и ЕРҮ. Соотношение полов среди ЕРҮ было равным, среди WРҮ 58% составляли самки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами было впервые описано наличие внебрачного отцовства у пеночки-трещотки, обитающей в средней полосе России. Процент ЕРҮ был достаточно велик и составил 25%, причем внебрачные потомки были найдены в 41% гнезд. Эти результаты отличаются от исследования, проведенного на шведской популяции пеночки-трещотки, где ЕРҮ не были обнаружены (Gyllensten *et al.*, 1990). Поскольку самцы данного вида ведут себя сходным образом в разных популяциях (Temrin, 1984; Temrin *et al.*, 1997; Горецкая, Гаврилов, 2017), различия в результатах можно объяснить применением разных классов генетических маркеров. Так, шведскими авторами был использован метод фингерпринтинга минисателлитной ДНК, который является менее эффективным, чем анализ микросателлитов.

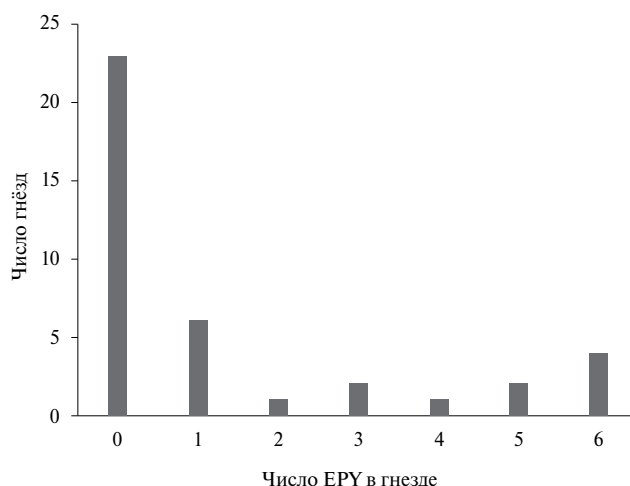


Рис. 1. Встречаемость ЕРҮ в гнездах.

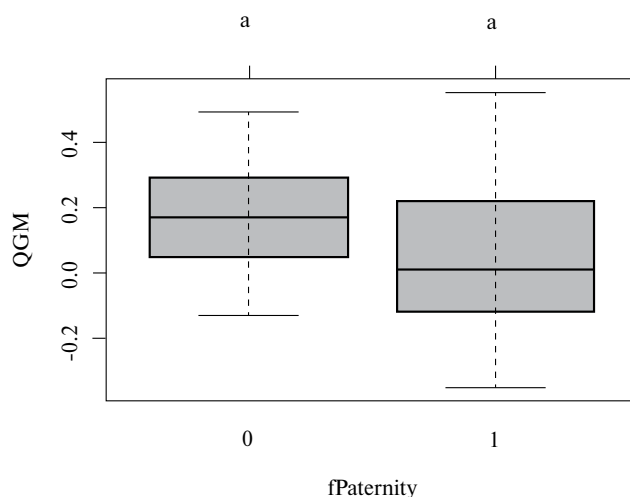


Рис. 2. Коэффициент родства (QGM) между самцом и самкой в паре у семей, в которых нет внебрачных потомков (0), и у семей с внебрачными потомками (1). Показаны медиана, максимум и минимум.

В пользу этого предположения говорит и тот факт, что в исследовании тех же авторов на пеночке-весничке (*Ph. trochilus*) также не были обнаружены внебрачные потомки, хотя в другой популяции этого вида была выявлена большая доля (23.5%) ЕРҮ (Gil *et al.*, 2007). Другое возможное объяснение расхождения данных — это размер выборки. Мы проанализировали 39 семей, 212 птенцов, а в работе Гилленстен с соавторами (Gyllensten *et al.*, 1990) всего проанализировано 13 семей и 56 птенцов. Доля ЕРҮ и гнезд с ними у пеночки-трещотки соответствует показателям, полученным для других видов пеночек. Так, у бурой пеночки было выявлено 45% ЕРҮ в 59% гнезд (Forstmeier *et al.*, 2002),

а у пеночки-веснички 23,5% ЕРУ в 47% гнезд (Gil *et al.*, 2007).

Поскольку многие факторы, такие как качество мест обитания (Ewen *et al.*, 2004; Cassey *et al.*, 2006), привлекательность самцов (Ellegren *et al.*, 1996; Griffith *et al.*, 2003) и социальный статус самок (Westerdahl *et al.*, 2000), могут по-разному влиять на выживаемость потомства разного пола, мы предполагали получить различия в соотношении полов у птенцов. Однако значимых отклонений в соотношении полов в выводках мы не обнаружили, хотя оно было несколько смещено в сторону самок. Птенцы разного пола не различались по массе тела и индивидуальной гетерозиготности. Такой результат можно объяснить стабильными условиями среды, благоприятными для популяции пеночки-трещотки.

При анализе отцовства из всего пула взрослых особей был выявлен только один потенциальный отец для ЕРУ. Этот результат противоречит данным по большинству видов, у которых были идентифицированы потенциальные отцы (Strohbach *et al.*, 1998; Canal *et al.*, 2011). Практически все поющие самцы пеночки-трещотки были пойманы на исследуемой территории. Однако в нашем пуле данных отсутствовали генотипы, соответствующие отцам ЕРУ. Таким образом, можно предположить, что самцы, производившие внебрачное потомство, не были территориальными. На исследуемом участке нами были выявлены нетерриториальные особи пеночки-трещотки (Горецкая, Гаврилов, 2017), которые, возможно, прилетали из неохваченных наблюдением участков леса.

Наши данные не подтвердили теорию “хороших генов” на том уровне, на котором мы могли ее проверить. Вес птенцов, который в том числе связан с их выживаемостью (Dreiss *et al.*, 2008), не отличался у WPY и ЕРУ. Этот вывод не согласуется с результатами, полученными для лазоревки *Parus caeruleus*, ЕРУ которой имели большую массу тела, чем WPY (Kempnaers *et al.*, 1997; Charmantier *et al.*, 2004, Dreiss *et al.*, 2008). Недавно было высказано предположение, что ЕРУ лазоревки вылупляются раньше, чем WPY, что можно объяснить принудительными копуляциями, происходящими до образования пары (Magrath *et al.*, 2009). К сожалению, у нас не было возможности наблюдать за порядком откладки яиц. Исходя из сходства в весе ЕРУ и WPY можно предположить, что в нашей популяции внебрачные копуляции могли иметь место на протяжении всего периода спаривания. Теория “хороших генов” подтверждена для многих видов, например, у лазоревки, варакушки *Luscinia svecica* и дроздовидной камышевки *Acrocephalus arundinaceus* внебрачные птенцы (ЕРУ) демонстрировали более сильный иммунный ответ, чем птенцы, принадлежащие социальному партнеру (WPY) (Kempnaers *et al.*, 1997; Sheldon *et al.*, 1997; Johnsen

et al., 2000; Foerster *et al.*, 2003). Однако прямых доказательств того, что птенцы, рожденные от более здоровых отцов, наследуют их характеристики, не получено (Edly-Wright *et al.*, 2007). Кроме того, выживаемость птенцов также зависит от внешних факторов, которые могут нивелировать воздействие генотипа (Arct *et al.*, 2013).

Наши данные также не подтверждают гипотезу “совместимых генов”, так как индивидуальная гетерозиготность ЕРУ в нашей популяции не выше, чем WPY. Генетическое сходство между птицами в паре также существенно не отличалось в семьях с ЕРУ и без них. Положительная связь между уровнем гетерозиготности и выживаемостью птенцов была продемонстрирована у некоторых видов. Так, у лазоревки ЕРУ не только имели большую массу тела (Dreiss *et al.*, 2008), но лучше и раньше оперялись, чем их сибсы (Kempnaers *et al.*, 1997; Charmantier *et al.*, 2004). Сходные данные получены и для тростниковой овсянки *Emberiza shouinicus* (Suter *et al.*, 2007). Однако в других исследованиях не удалось найти связи между внебрачным отцовством и гетерозиготностью потомков. Например, по данным Кливен с соавторами WPY и ЕРУ тростниковой овсянки имели одинаковый уровень гетерозиготности (Kleven *et al.*, 2005), а WPY варакушки имели даже более высокий уровень гетерозиготности, чем ЕРУ (Fossoy *et al.*, 2007). В одном из метаанализов (Akçay, Roughgarden, 2007) не было обнаружено значительной связи между степенью родства социальных партнеров и вероятностью появления ЕРУ. Напротив, в недавнем метаанализе (Arct *et al.*, 2015) была обнаружена положительная связь между появлением ЕРУ и степенью родства между социальными партнерами. Поскольку наши результаты основаны только на данных по шести микросателлитным локусам, их может быть недостаточно для проведения подобного сравнения. С другой стороны, метаанализ Аркт с соавторами (Arct *et al.*, 2015) показал, что количество использованных микросателлитных локусов не оказывает влияния на оценку уровня гетерозиготности.

Наши результаты согласуются с альтернативной гипотезой о том, что ЕРС являются результатом отбора на демонстрационное поведение самцов (Forstmeier *et al.*, 2014, Hsu *et al.*, 2015, Nakagawa *et al.*, 2015, Brouwer *et al.*, 2017). Известно, что самцы пеночки-трещотки продолжают активно петь после образования пары и даже демонстрируют политерриториальное поведение. Они поют на второстепенных территориях (от 150 до 1400 м от первой) для привлечения дополнительных самок, пока их самка насиживает яйца (Temrin, 1984; Temrin *et al.*, 1997). Кроме того, по нашим неопубликованным данным, полученным с помощью радиотрекинга, самцы посещают гнезда соседей по поселению на разных стадиях гнездового цикла. Мы полагаем, что такое поведение самцов на стадии формирования

пар может способствовать ЕРС. Например, самцы лазоревки, совершавшие набеги по чужим гнездам, с большей вероятностью производили внебрачных потомков, чем самцы, которые держались вблизи социального партнера (Schlicht *et al.*, 2015). Таким образом, участие в ЕРС может быть побочным продуктом отбора на рекламное поведения самцов, которое приводит к снижению охраны самки. Этим в свою очередь могут пользоваться нетерриториальные самцы, присутствующие в избытке.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В. Н. Москаленко и всем студентам, принимавшим участие в отловах и наблюдениях за птицами в рамках студенческих самостоятельных работ на ЗБС с 2010 по 2015 г.

Работа выполнена в рамках Государственного задания, части 2 п. 01 10 (тема № 121032300103-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Горецкая М.Я., Гаврилов В.В. Численность и территориальная структура популяции пеночки-трещотки (*Phylloscopus sibilatrix*) на Звенигородской биостанции МГУ за 2000–2016 гг. // Динамика численности птиц в наземных ландшафтах. 2017. С. 204–206.
- Akçay E., Roughgarden J. Extra-pair paternity in birds: Review of the genetic benefits // *Evol. Ecol. Res.* 2007. V. 9. P. 855–868.
https://repository.upenn.edu/biology_papers/12
- Albrecht T., Kreisinger J., Piálek J. The strength of direct selection against female promiscuity is associated with rates of extrapair fertilizations in socially monogamous songbirds // *Am. Nat.* 2006. V. 167. P. 739–744.
<https://doi.org/10.1086/502633>
- Arct A., Drobniak S.M., Podmokła E., Gustafson L., Cichoń M. Benefits of extra-pair mating may depend on environmental conditions – an experimental study in the Blue Tit (*Cyanistes caeruleus*) // *Behav. Ecol. Sociobiol.* 2013. V. 67. P. 1809–1815.
<https://doi.org/10.1007/s00265-013-1588-4>
- Arct A., Drobniak S.M., Cichoń M. Genetic similarity between mates predicts extrapair paternity – a meta-analysis of bird studies // *Behav. Ecol.* 2015. V. 26. P. 959–968.
<https://doi.org/10.1093/beheco/arv004>
- Bensch S., Price T., Kohn J. Isolation and characterization of microsatellite loci in a *Phylloscopus* warbler // *Mol. Ecol.* 1997. V. 6. P. 91–92.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.00150.x>
- Brouwer L., van de Pol M., Aranzamendi N.H., Bain G., Baldassarre D.T., Brooker L.C., Brooker M.G., Colombelli-Négrel D., Enbody E., Gielow K., Hall M.L., Johnson A.E., Karubian J., Kingma S.A., Kleindorfer S., Louter M., Mulder R.A., Peters A., Pruett-Jones S., Tarvin K.A., Thrasher D.J., Varian-Ramos C.W., Webster M.S., Cockburn A. Multiple hypotheses explain variation in extra-pair paternity at different levels in a single bird family // *Mol. Ecol.* 2017 (published online).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mec.14385>
- Cassey P., Ewen J.G., Møller A.P. Revised evidence for facultative sex ratio adjustment in birds: a correction // *Proc. Biol. Sci.* 2006. V. 273. P. 3129–3130.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3628>
- Canal D., Potti J.A., Davilla J. Male phenotype predicts extra-pair paternity in Pied Flycatchers // *Behav.* 2011. V. 148. P. 691–712.
<https://doi.org/10.1163/000579511X573917>
- Charmantier A., Blondel J., Perret P., Lambrechts M.M. Do extra-pair paternities provide genetic benefits for female Blue Tits *Parus caeruleus*? // *J. Avian. Biol.* 2004. V. 35. P. 524–532.
<https://doi.org/10.2307/3677557>
- Dawson D.A., Hanotte O., Greig C., Stewart I.R., Burke T. Polymorphic microsatellites in the Blue Tit *Parus caeruleus* and their cross-species utility in 20 songbird families // *Mol. Ecol.* 2000. V. 9. P. 1941–1944.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01094-14.x>
- Dreiss A.N., Navarro C., De Lope F., Møller A.P. Effects of an immune challenge on multiple components of song display in Barn Swallows *Hirundo rustica*: implications for sexual selection // *Ethology* 2008. V. 114. P. 955–964.
<https://doi.org/10.1111/J.1439-0310.2008.01546.X>
- Edly-Wright C., Schwagmeyer P.L., Parker P.G., Mock D.W. Genetic similarity of mates, offspring health and extrapair fertilization in House Sparrows // *Anim. Behav.* 2007. V. 73. P. 367–378.
<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2006.08.008>
- Ellegren H., Gustafsson L., Sheldon B.C. Sex ratio adjustment in relation to paternal attractiveness in a wild bird population // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 11723–11728.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11723>
- Ewen J.G., Cassey P., Møller A.P. Facultative primary sex ratio variation: a lack of evidence in birds // *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2004. V. 271. P. 1277–1282.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2735>
- Foerster K., Delhey K., Johnsen A., Liffeld J.T., Kempenaers B. Females increase offspring heterozygosity and fitness through extra-pair matings // *Nature.* 2003. V. 425. P. 714–717.
<https://doi.org/10.1038/nature01969>
- Forstmeier W., Kempenaers B., Meyer A., Leisler B. A novel song parameter correlates with extra-pair paternity and reflects male longevity // *Proc. R. Soc. B. Biol. Sci.* 2002. V. 269. P. 1479–1485.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2039>
- Forstmeier W., Nakagawa S., Griffith S.C., Kempenaers B. Female extra-pair mating: adaptation or genetic constraint? // *Trends Ecol. Evol.* 2014. V. 29. P. 456–464.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.05.005>
- Fossøy F., Johnsen A., Liffeld J.T. Multiple genetic benefits of female promiscuity in a socially monogamous

- passerine // *Evolution* (N. Y.). 2007. V. 62. P. 145–156. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00284.x>
- Gelter H.P., Tegelström H. High frequency of extra-pair paternity in Swedish Pied Flycatchers revealed by allozyme electrophoresis and DNA fingerprinting // *Behav. Ecol. Sociobiol.* 1992. V. 31. P. 1–7. <https://doi.org/10.1007/BF00167810>
- Gil D., Slater P.J.B., Graves J.A. Extra-pair paternity and song characteristics in the Willow Warbler *Phylloscopus trochilus* // *J. Avian Biol.* 2007. V. 38. P. 291–297. <https://doi.org/10.1111/j.2007.0908-8857.03868.x>
- Griffiths R., Double M.C., Orr K., Dawson R.J.G. A DNA test to sex most birds // *Molecular Ecology*. 1998. V. 7. P. 1071–1075.
- Griffith S.C., Immler S. Female infidelity and genetic compatibility in birds: the role of the genetically loaded raffle in understanding the function of extra-pair paternity // *J. Avian Biol.* 2009. V. 40. P. 97–101. <https://doi.org/10.1111/j.1600-048X.2009.04562.x>
- Griffith S.C., Ornborg J., Russell A.F., Andersson S., Sheldon B.C. Correlations between ultraviolet coloration, overwinter survival and offspring sex ratio in the blue tit // *J. Evol. Biol.* 2003. V. 16. P. 1045–1054. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2003.00550.x>
- Griffith S.C., Owens I.P.F., Thuman K.A. Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function // *Mol. Ecol.* 2002. V. 11. P. 2195–2212. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01613.x>
- Gyllenstein U.B., Jakobsson S., Temrin H. No evidence for illegitimate young in monogamous and polygynous warblers // *Lett. To Nat.* 1990. V. 346. P. 183–187. <https://doi.org/10.1038/343168a0>
- Hasselquist D., Bensch S., von Schantz T. Correlation between male song repertoire, extra-pair paternity and offspring survival in the great reed warbler // *Nature* 1996. V. 381. P. 229–232. <https://doi.org/10.1038/381229a0>
- Hsu Y.-H., Schroeder J., Winney I., Burke T., Nakagawa S. Are extra-pair males different from cuckolded males? A case study and a meta-analytic examination // *Mol. Ecol.* 2015. V. 24. P. 1558–1571. <https://doi.org/10.1111/mec.13124>
- Jones A.G. GERUD2.0: a computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents // *Mol. Ecol. Notes*. 2005. V. 5. P. 708–711. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01029.x>
- Jennions M.D., Petrie M. Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits // *Biol. Rev.* 2000. V. 75. P. 21–64. <https://doi.org/10.1017/S0006323199005423>
- Johnsen A., Andersen V., Sunding C., Lifjeld J.T. Female Bluethroats enhance offspring immunocompetence through extra-pair copulations // *Nature*. 2000. V. 406. P. 296–299. <https://doi.org/10.1038/35018556>
- Kempenaers B., Verheyen G.R., Dhondt A.A. Extra-pair paternity in the Blue Tit (*Parus caeruleus*): female choice, male characteristics, and offspring quality // *Behav. Ecol.* 1997. V. 8. P. 481–492. <https://doi.org/10.1093/beheco/8.5.481>
- Keller L.F., Waller D.M. Inbreeding effects in wild populations // *Trends Ecol. Evol.* 2002. V. 17. P. 230–241. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02489-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02489-8)
- Kleven O., Lifjeld J.T. No evidence for increased offspring heterozygosity from extra-pair mating in the Reed Bunting (*Emberiza schoeniclus*) // *Behav. Ecol.* 2005. V. 16. P. 561–565. <https://doi.org/10.1093/beheco/ari027>
- Leder E.H., Karaiskou N., Primmer C.R. Seventy new microsatellites for the Pied Flycatcher, *Ficedula hypoleuca* and amplification in other passerine birds // *Mol. Ecol. Resour.* 2008. V. 8. P. 874–880. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02096.x>
- Magrath M.J.L., Vedder O., van der Velde M., Komdeur J. Maternal effects contribute to the superior performance of extra-pair offspring // *Curr. Biol.* 2009. V. 19. P. 792–797. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.068>
- Møller A.P., Erritzøe J. Climate, body condition and spleen size in bird // *Oecologia*. 2003. V. 137. P. 621–626. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1378-1>
- Nakagawa S., Schroeder J., Burke T. Sugar-free extra-pair mating: a comment on Arct et al. // *Behav. Ecol.* 2015. V. 26. P. 971–972. <https://doi.org/10.1093/BEHECO/ARV041>
- Neff B.D., Pitcher T.E. Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. P. 19–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02395.x>
- Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Mol. Ecol. Notes*. 2006. V. 6. P. 288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Peakall R., Smouse P.E. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update // *Bioinformatics* 2012. V. 28. P. 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Petrie M., Kempenaers B. Extra-pair paternity in birds: explaining variation between species and populations // *Trends Ecol. Evol.* 1998. V. 13. P. 52–58. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(97\)01232-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(97)01232-9)
- Pinheiro J., Bates D., DebRoy S., Sarkar D. R Core Team. nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1–137, 2018. <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>
- Pipoly I., Bókony V., Kirkpatrick M., Donald P.F., Székely T., Liker A. The genetic sex-determination system predicts adult sex ratios in tetrapods // *Nature*. 2015. V. 527. P. 91–94.

- Primmer C., Møller A., Ellegren H. New microsatellites from the Pied Flycatcher *Ficedula hypoleuca* and the Swallow *Hirundo rustica* genomes // *Hereditas* 1996. V. 124. P. 281–284.
<https://doi.org/10.1038/nature15380>
- Richardson D.S., Jury F.L., Blaakmeer K., Komdeur J., Burke T. Parentage assignment and extra-group paternity in a cooperative breeder: The Seychelles Warbler (*Acrocephalus sechellensis*) // *Mol. Ecol.* 2001. V. 10. P. 2263–2273.
<https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01355.x>
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing // Vienna, Austria. 2021.
URL <https://www.R-project.org/>
- Queller D.C., Goodnight K.F. Estimating relatedness using molecular markers // *Evolution*. 1989. V. 43. P. 258–275.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb04226.x>
- Santos E.S.A., Santos L.L.S., Lagisz M., Nakagawa S. Conflict and cooperation over sex: the consequences of social and genetic polyandry for reproductive success in Dunnocks // *J Anim. Ecol.* 2015. V. 84. P. 1509–1519.
<https://doi.org/10.1111/1365-2656.12432>
- Sheldon B.C., Merilo J., Qvarnstrom A., Gustafsson L., Ellegren H. Paternal genetic contribution to offspring condition predicted by size of male secondary sexual character // *Proc. R. Soc. B. Biol. Sci.* 1997. V. 264. P. 297–302.
<https://doi.org/10.1098/rspb.1997.0042>
- Schlicht L., M. Valcu, B. Kempenaers B. Male extraterritorial behaviour predicts extrapair paternity pattern in blue tits, *Cyanistes caeruleus* // *Behav. Ecol.* 2015. V. 26. P. 1404–1413.
- Suter S.M., Keiser M., Feignoux R., Meyer D.R. Reed Bunting females increase fitness through extra-pair mating with genetically dissimilar males // *Proc. R. Soc. B. Biol. Sci.* 2007. V. 274. P. 2865–2871.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0799>
- Strohbach S., Curio E., Bathen A., Epplen J.T., Lubjuhn T. Extra-pair paternity in the great tit (*Parus major*): a test of the “good genes” hypothesis // *Behav. Ecol.* 1998. V. 9. P. 388–396.
- Temrin H., Brodin A., Åkerström O., Stenius S. Parental investment in monogamous pairs of Wood Warblers (*Phylloscopus sibilatrix*) // *J. Ornithol.* 1997. V. 138. P. 93–101.
<https://doi.org/10.1007/BF01651655>
- Temrin H. Why are some Wood Warbler (*Phylloscopus sibilatrix*) males polyterritorial // *Ann. Zool. Fennici.* 1984. V. 21. P. 243–247.
- Tregenza T., Wedell N. Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: invited review // *Mol. Ecol.* 2000. V. 9. P. 1013–1027.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00964.x>
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data // *Mol. Ecol. Notes* 2004. V. 4. P. 535–538.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
- Zuur A.F., Ieno E.N., Walker N.J., Saveliev A.A., Smith G.M. Mixed effects models and extensions in ecology with R. Springer, 2009. 574 p.
<https://doi.org/10.18637/jss.v032.b01>
- Westerdahl H., Bensch S., Hansson B., Hasselquist D., von Schantz T. Brood sex ratios, female harem status and resources for nestling provisioning in the great reed warbler (*Acrocephalus arundinaceus*) // *Behav. Ecol. Sociobiol.* 2000. V. 47. P. 312–318.
<https://doi.org/10.1007/s002650050671>

Extra-pair paternity in the Wood Warbler (*Phylloscopus sibilatrix*) in Central Russia

M. I. Goretskaia^{1, #}, Yu. S. Belokon², M. M. Belokon³

¹Zvenigorod Biological Station, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory, Moscow, 119991 Russia

²Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Gubkin st. 3, Moscow, 119991 Russia

[#]e-mail: m.goretskaia@gmail.com

Extra-pair paternity is widespread in passerine birds. The number of extra-pair young (EPY) varies among different species and populations of the same species. We tested if it is a case for a small passerine bird with poly-territorial behaviour, the Wood Warbler (*Phylloscopus sibilatrix*). The results are based on the microsatellite analysis of seven loci and revealed a high level of EPY in Central Russia population of Wood Warbler (EPY in 41% of all nests, 16 of 39 nests; 25% of all young were EPY, 52 of 212 young). We did not find relationship between relatedness among mates in the pair and the presence of EPY. There was no difference in heterozygosity and body mass between EPY and within pair young (WPY). Possible causes of extra-pair paternity are discussed.

Keywords: Extra-pair paternity, body mass, mate relatedness, heterozygosity, microsatellites, Wood Warbler

РЕГУЛИРУЕТ ЛИ ГРЕБНЕВИК *MNEMIOPSIS LEIDYI* А. AGASSIZ, 1865 СОСТАВ И БИОМАССУ МЕЗОЗООПЛАНКТОНА В ГЛУБОКОВОДНЫХ РАЙОНАХ ЧЕРНОГО МОРЯ?

©2024 г. Б. Е. Аннинский*, @, Г. А. Финенко*, Н. А. Дацык*

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

@E-mail: anninsky_b@mail.ru

Поступила в редакцию 21.06.2022 г.

После доработки 27.07.2023 г.

Принята к публикации 31.07.2023 г.

Исследовали численность, биомассу и влияние на зоопланктон гребневика *Mnemiopsis leidyi* в глубоководных районах Черного моря в октябре 2019 г. При численности гребневика, варьирующей от 16 до 38 экз. м^{-2} , его биомасса в открытом море изменялась от 100 до 200 г м^{-2} и была сравнительно выше на северо-западной периферии восточного циклонического круговорота. Несмотря на доминирование в популяции крупных особей (≥ 30 мм), активность их размножения была крайне слабой. Удельный суточный рацион достигал 4–13% углерода тела взрослых и ювенильных особей соответственно, и превышал минимальные потребности гребневика в пище. Ежесуточное потребление им трех видов копепоид (*Acartia* spp., *Calanus euxinus*, *Oithona davisae*) приближалось к 4.5–11% их биомассы, но было менее 1.6% для аппендикулярии *Oikopleura (Vexillaria) dioica*. Потери всего зоопланктона за счет хищничества гребневика *M. leidyi* находились в пределах 2–4% от биомассы потенциальных жертв.

Ключевые слова: Черное море, *Mnemiopsis leidyi*, копепоиды, пищевой спектр, суточный рацион, пищевые потребности

DOI: 10.31857/S1026347024010104, **EDN:** LNLGNN

Будучи обязательным компонентом морских пелагических экосистем, хищный желетелый макрозоопланктон является важным элементом структурно-функциональной организации сообществ, основным трофическим конкурентом рыб-планктофагов, а также потребителем их икры и личинок. Из-за конкуренции и внешних условий популяции желетелых ежегодно развиваются неодинаково, чаще образуя максимумы обилия с приблизительной периодичностью в 20 лет (Condon *et al.*, 2013). В немалой степени экспансии желетелых способствует эвтрофикация, сокращение популяций рыб, активное судоходство и изменение климата (Purcell *et al.*, 2007). При этом “каскадные эффекты” могут качественно и количественно изменять нативные экосистемы (Vinogradov *et al.*, 1999; Dinasquet *et al.*, 2012).

Гребневик *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865, вселившийся в Черное море в 1980-х гг., к настоящему времени прочно вошел как компонент экосистемы во все южные (Черное, Азовское, Каспийское, Мраморное, Средиземное), а также некоторые западные (Северное и Балтийское) моря (Vinogradov

et al., 1989; Studenikina *et al.*, 1991; Ivanov *et al.*, 2000; Shiganova *et al.*, 2001, 2019; Javidpour *et al.*, 2006; Boersma *et al.*, 2007; Ghabooli *et al.*, 2011). Быстрое освоение новых мест обитания свидетельствует, с одной стороны, о резко возросших рисках экологической интервенции, с другой — об экологическом оппортунизме данного вида, способного адаптироваться к крайне широким колебаниям биотических и абиотических условий.

С проникновением в Черное море в 1997–1998 гг. гребневика *Beroe ovata* Bruguère, 1789 (Konsulov, Kamburska, 1998), питающегося исключительно гребневиками-планктофагами, биомасса *M. leidyi* сократилась в глубоководных районах в среднем с 300–500 до ~ 50 г м^{-2} (Kideys, 2002, Mutlu, 2009). На внешнем шельфе Севастопольской бухты она составляла в июне — августе 2002–2019 гг. 55–470 г м^{-2} и зависела в основном от температуры поверхностного слоя моря (ТПМ) в январе — феврале ($r = -0.55$; $p < 0.05$) (Anninsky *et al.*, 2022). Это означает, что в отличие от массовых видов тепловодного мезозоопланктона (*Paracalanus parvus*, *Oithona davisae* и др.) популяция гребневика

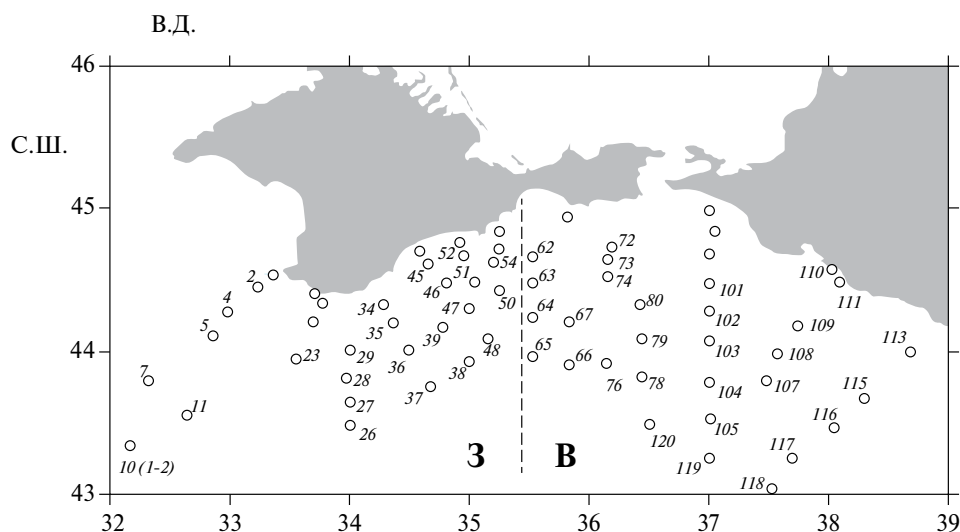


Рис. 1. Станции планктонных работ в 110-м рейсе НИС “Профессор Водяницкий” в октябре 2019 г. Цифрами обозначены номера глубоководных станций, пунктиром — условное разделение района исследований на западный (З) и восточный (В) сектора.

развивалась сильнее в годы с холодной зимой, когда происходило активное конвективное перемешивание водных масс. Однако такое явление могло быть вызвано и тем, что в эти годы *B. ovata* появлялся в планктоне позже обычного (Anninsky *et al.*, 2023) и *M. leidy* имел больше времени для сезонной экспансии. Очевидно, что межгодовые флуктуации обилия и распределения *M. leidy* — это результат комплексного влияния на его популяцию многих внешних факторов, в ряду которых первостепенное значение имеет обеспеченность пищей, температура морской воды и хищнический пресс со стороны *B. ovata* (Delpy *et al.*, 2016; Vereschaka *et al.*, 2019).

В отличие от районов шельфа, для которых ранее получены наиболее длинные временные ряды, характеризующие состояние сообществ желелетелых организмов и их влияние на нижние трофические звенья (Финенко и др., 2021, Finenko *et al.*, 2013, 2018a), глубоководная часть Черного моря оставалась в этом отношении недостаточно изученной (Vinogradov *et al.*, 1999; Arashkevich *et al.*, 2014). Здесь при абсолютном доминировании в биомассе мезозoopланктона копеподы *Calanus euxinus* (Arashkevich *et al.*, 2014) и ином режиме циркуляции водных масс (Иванов, Белокопытов, 2011) для желелетелых хищников формируются трофические условия, которые существенно отличаются от таковых в прибрежных районах. Имеет значение и то, что из-за продолжающегося потепления в Черноморском регионе (Новикова, Полонский, 2018; Востоков и др., 2019) в море в последние годы развились негативные процессы: повысилась температура холодного промежуточного слоя (ХПС),

снизилась концентрация кислорода и насыщение им глубинных горизонтов, изменился биогенный режим верхней эпипелагиали (Видничук, Коновалов, 2021). Все эти явления могут иметь значение и для формирования популяций макрозоопланктона.

Цель настоящей работы: 1) оценка количественного потребления гребневиком *M. leidy* мезозoopланктонных организмов в глубоководных районах Черного моря; 2) определение степени трофического влияния *M. leidy* на состав и количественные показатели мезозoopланктонных сообществ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использован материал, собранный в ходе 110-го рейса НИС “Профессор Водяницкий” в период с 7 по 21 октября 2019 г. в западном (З) и восточном (В) глубоководных районах Черного моря (координаты 43°02–44°56 с.ш. и 32°10–38°40 в.д. (рис. 1).

Пробы макрозоопланктона отбирались сетью Богорова — Расса (диаметр входного отверстия 80 см, размер ячеек 500 мкм). Исследование структуры и численности популяции *M. leidy* проводили на 56 станциях (26 ст. на западе и 30 ст. на востоке), питания — на 26 станциях (12 ст. на западе, 14 ст. на востоке). Видовой и количественный состав пищи изучен у 167 особей *M. leidy* с орально-аборальной длиной от 8 до 76 мм. На каждой станции с помощью зонда Sea-Bird’s 911 *plus* CTD (США) измеряли температуру, соленость и относительную плотность морской воды (σ_t). В районах с глубинами от 430 до 2160 м облавливали слой от нижней границы

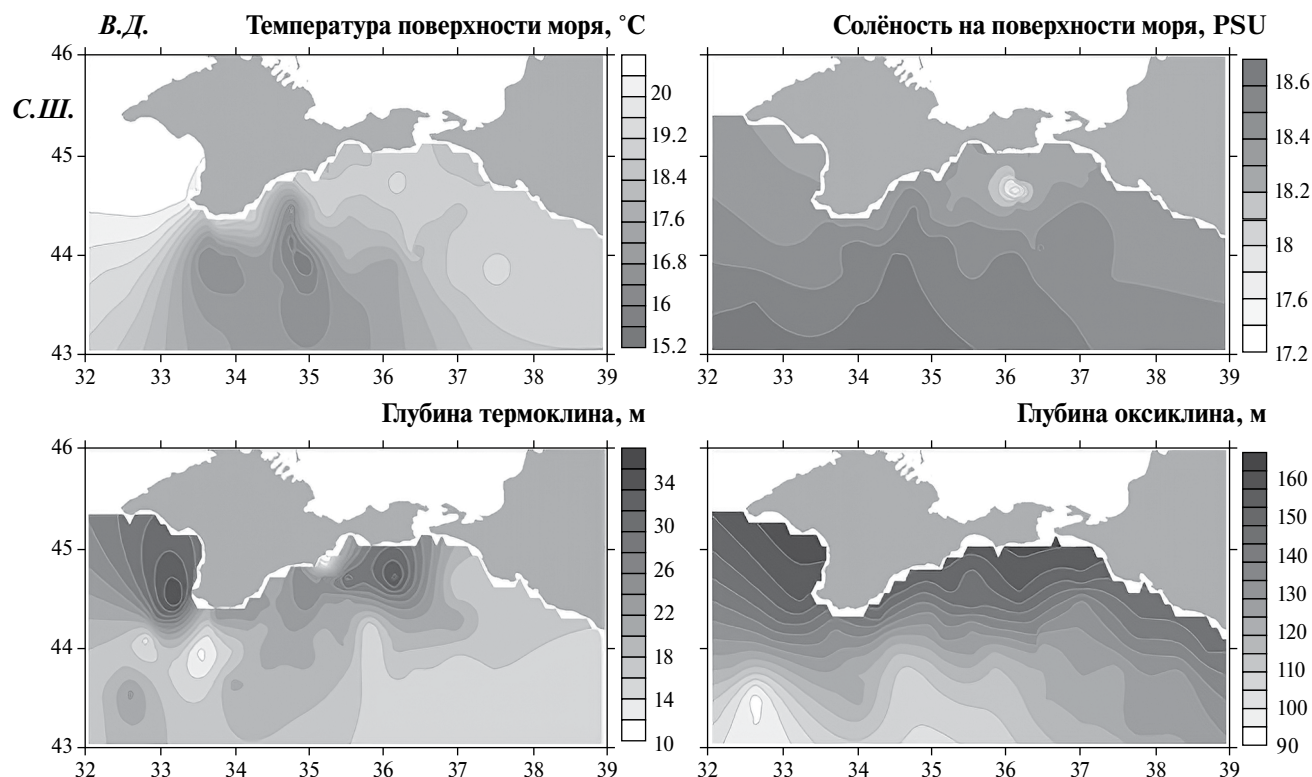


Рис. 2 Пространственное распределение температуры (°C) и солёности (PSU) на поверхности моря, а также глубины залегания (м) верхней границы термоклина и нижней границы кислородной зоны Черного моря в период с 7 по 21 октября 2019 г.

кислородной зоны ($\sigma_t = 16.2$), находившейся на глубине 93–157 м, до поверхности моря. Особей подсчитывали и измеряли непосредственно после вылова для последующего расчета биомассы. Для определения количественного и качественного состава пищи их фиксировали 2% раствором нейтрализованного боратами формалина. Таксономический состав жертв и их количество определяли в камере Богорова под микроскопом МБС-10 (Россия) при увеличении $8\times$ (2-4). Для перехода от длины к массе тела организмов использовали известные размерно-весовые соотношения (Aleksandrov *et al.*, 2014).

Пробы мезозoopланктона отбирались с помощью малой сети Джеди (диаметр входного отверстия 38 см, размер ячеи 140 мкм) тотальным ловом от поверхности до нижней границы кислородного слоя ($\sigma_t = 16.2$) на пяти станциях в западном и пяти станциях в восточном секторах. Пробы фиксировали 4% раствором нейтрализованного боратами формалина сразу после вылова и в дальнейшем изучали с использованием стандартной методики обработки проб (Aleksandrov *et al.*, 2014).

На основе численности, состава и индивидуальной массы жертв рассчитывали их время переваривания гребневиком, его суточный рацион

и освобожденный от организмов объем морской воды, обеспечивающий такое количество пищи. Облавливаемый объем (CR л экз.⁻¹ ч⁻¹) находили для всех доминирующих видов жертв и зоопланктона в целом по формуле

$$CR = N_1/N,$$

где N_1 — количество потребленных жертв данного вида (экз. ч⁻¹), N — их численность в планктоне (экз. л⁻¹).

Выедание мезозoopланктона гребневиком *M. leidy* оценивали на основании рациона особей и размерной структуры популяции хищника, а также биомассы и состава мезозoopланктона в море. Так как зоопланктонных станций было меньше, чем станций, где изучали питание, расчет интенсивности выедания организмов проводили с учетом биомассы мезозoopланктона на ближайших станциях.

При переходе в расчетах от сырой массы к органическому углероду тела принимали, что у *M. leidy* сухая масса тела составляет 2.2% от сырой, у зоопланктона — 20%, содержание углерода — 4% и 40% сухой массы соответственно (Финенко, Романова, 2000, Arashkevich *et al.*, 2014).

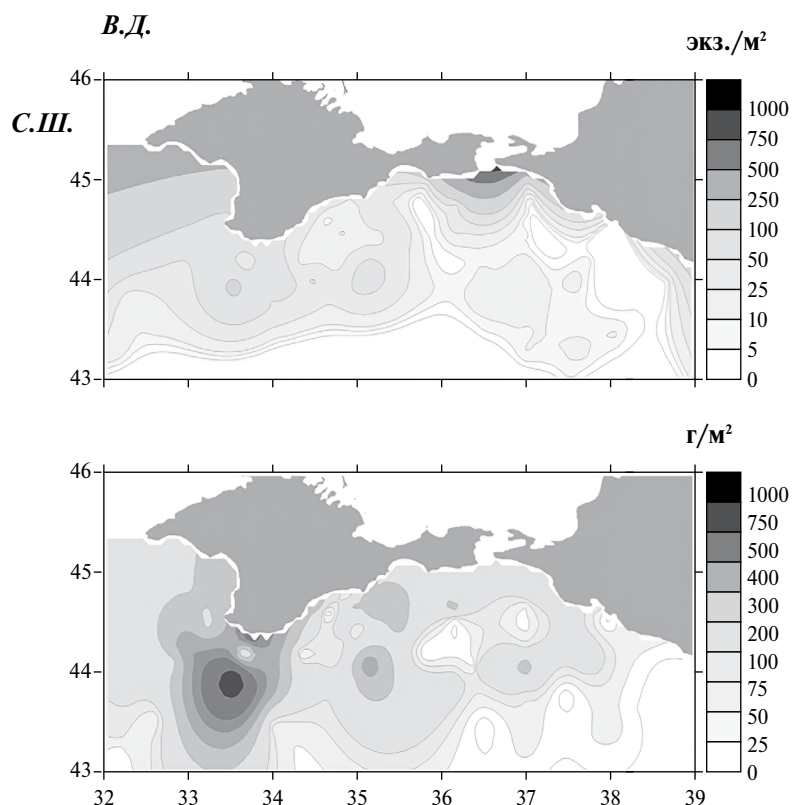


Рис. 3. Численность (экз. м⁻²) и биомасса (г м⁻²) гребневика *Mnemiopsis leidy* в северной глубоководной части Черного моря в октябре 2019 г.

Обеспеченность пищей *M. leidy* оценивали, сопоставляя ассимилируемую пищу с минимальными пищевыми потребностями гребневика, рассчитанными по скорости потребления кислорода (СПК) (Аболмасова, 2001):

$$Q = 0.012e^{(0.098T)} DW^{0.78} 0.536,$$

где Q – СПК, мг С экз.⁻¹ час⁻¹, T – температура, °С, DW – сухая масса тела, мг, 0.536 – коэффициент перехода от миллилитров кислорода к миллиграммам углерода. Усвояемость пищи этим видом принимали равной 80%.

Обработка результатов исследований проводилась с использованием статистических пакетов Microsoft Excel 98, Grafer и Surfer для Windows. Во всех случаях приведены средние и значения стандартной ошибки (SE).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гидрологические условия в районе исследований. Температура поверхностного слоя в исследуемый период изменялась в западном секторе от 15.6 до 20.4°C (средняя $18.03 \pm 0.28^\circ\text{C}$), в восточном – от 17.3 до 19°C (средняя $18.64 \pm 0.13^\circ\text{C}$) (рис. 2).

Поле понижения температуры южнее п-ова Крым указывает на значительное поступление глубинных холодных вод к поверхности, что в этом районе в основном было связано с активностью Восточного циклонического круговорота. Об этом же свидетельствует топографически близкий к изменению температуры рост солёности поверхностных вод. На станциях западного сектора солёность варьировала в пределах 18.28–18.62 PSU (средняя 18.4 ± 0.02 PSU), на востоке интервал ее изменений был шире – от 17.37 до 19.36 PSU (средняя 18.6 ± 0.1 PSU) при минимальных значениях (17.37–18.27 PSU) на ст. 72–73. Снижение солёности на этих станциях было вызвано выносом в Керченское предпроливье распресненных вод Азовского моря.

Нижняя граница верхнего квазиоднородного слоя (ВКС), соответствующая верхней границе термоклина, на западе и востоке глубоководной части моря находилась приблизительно в одном глубинном слое: соответственно 11–36 м (в среднем 21.0 ± 1.0 м) и 14–34 м (в среднем 20.0 ± 1.4 м). В обоих случаях глубина залегания термоклина в основном регулировалась мезомасштабной циркуляцией водных масс: поднималась в районах циклонической циркуляции и опускалась в ядрах

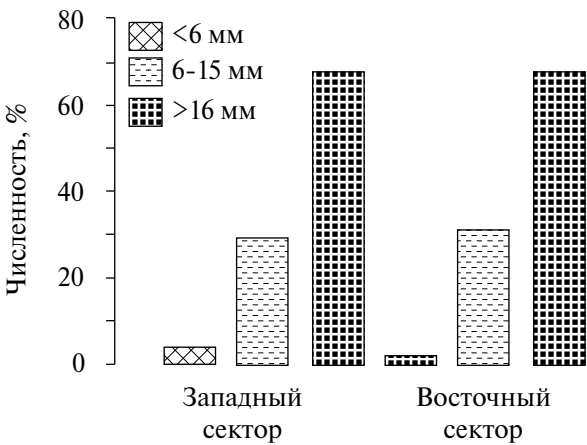


Рис. 4. Относительная численность (%) личинок, постличиночных возрастных стадий и взрослых особей в популяции *M. leidy* из западного и восточного секторов глубоководной части Черного моря в октябре 2019 г.

антициклонических вихрей, среди которых особенно заметны Севастопольский и Крымский антициклоны.

Численность, биомасса и структура популяции гребневика *M. leidy*. Численность *M. leidy* в исследованной глубоководной части моря в октябре 2019 г. составляла в среднем 26 ± 3 экз. м^{-2} , биомасса — 144 ± 21 г м^{-2} . Пространственное распределение особей было крайне неоднородным: биомасса варьировала от < 10 г м^{-2} (ст. 45, 107, 110, 113, 118, 120) до > 1000 г м^{-2} (ст. 23). В целом численность и биомасса *M. leidy* в западном секторе была в 2 раза больше, чем в восточном (рис. 3). Возможно, это могло быть вызвано вытеснением поверхностных водных масс — предпочитаемой среды

Таблица 1. Количественные характеристики особей в популяции *M. leidy* из западного и восточного секторов глубоководной части Черного моря в октябре 2019 г.

Показатель	Западный сектор	Восточный сектор
Численность, экз. м^{-2}	38.3 ± 5.5	16.0 ± 2.3
Биомасса, г м^{-2}	201.6 ± 39.6	96.4 ± 14.7
Сырая масса тела, г экз. $^{-1}$	5.2 ± 0.4	6.2 ± 0.8
Сухая масса тела, г экз. $^{-1}$	$(1.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-1}$	$(1.4 \pm 0.1) \cdot 10^{-1}$
Содержание углерода, мг С экз. $^{-1}$	4.5 ± 0.4	5.5 ± 0.4

обитания гребневика, к периферии циклонической циркуляции или нередко наблюдающейся аккумуляцией зоопланктона в зоне конвергенции Основного черноморского течения (ОЧТ) у Южного берега Крыма. Примечательно, что таких желетелых хищников, как *Aurelia aurita* (Linnaeus, 1758) и *Pleurobrachia pileus* (O. F. Muller, 1776), здесь в октябре 2019 г. было также больше, чем в других районах.

Структура популяции гребневика *M. leidy* на западе была идентична таковой на востоке: в обоих случаях на долю личиночных стадий приходилось 1–4% всех особей, ювенильных — до 30% и взрослых особей до 70% (рис. 4).

Низкая численность личинок и отсутствие яиц (особенно в восточном секторе) означает, что, несмотря на численное преобладание (~70%) в популяции крупных особей, интенсивность их размножения в октябре 2019 г., а также летом этого года оставалась аномально низкой. Причины этого явления неясны и могут быть связаны как с прежними, так и нынешними условиями сезонного развития *M. leidy*. При сходной размерной структуре популяции в восточном секторе гребневика были немного крупнее, что привело к большей сухой массе и содержанию углерода в теле этих особей (табл. 1).

Состав, численность и биомасса мезозоопланктона. Таксономическая структура сообществ мезозоопланктона была характерна для середины осени (Загородняя и др., 2023). Во всех глубоководных районах численно доминировали копеподы (табл. 2). Ветвистоусые рачки были представлены встречавшейся единично *Penilia avirostris*.

Средняя численность мезозоопланктона была выше в восточном секторе, где чаще встречались науплиусы копепод и старшие возрастные стадии копеподы *Pseudocalanus elongatus*, а также аппендикулярия *Oikopleura (Vexillaria) dioica*. Науплиусы копепод доминировали повсеместно и составляли 20% численности мезозоопланктона на западе и до 32% — на востоке (табл. 2). Кроме того, в обоих секторах наблюдалась высокая численность циклопоидной копеподы *Oithona similis*, близкая к 20% всей численности организмов. Другой циклопоидный вид — *O. davisae* встречался в море реже и имел относительную численность в исследуемых районах около 10% (табл. 2). Копеподы *Acartia* spp. занимали субдоминирующую позицию по численности и были представлены двумя морфологически сходными видами: *Acartia clausi* и *Acartia tonsa*. Суммарная численность других таксономических групп и видов мезозоопланктона не превышала 8% от всех организмов.

Доля отдельных таксономических групп и видов в биомассе мезозоопланктона изменялась главным образом в зависимости от присутствия крупной

Таблица 2. Численность (экз. м^{-3}), биомасса (мг м^{-3}) организмов, структура мезозoopланктонного сообщества (% общей численности) в глубоководных районах Черного моря в октябре 2019 г.

Таксон	Западный сектор				Восточный сектор			
	экз. м^{-3}	%	мг м^{-3}	%	экз. м^{-3}	%	мг м^{-3}	%
<i>Acartia</i> sp.	219.2 ± 70.5	17.0	22.1 ± 1.5	5.83	151.1 ± 30.4	10.8	1.3 ± 0.4	1
<i>Calanus euxinus</i>	34.1 ± 12.8	2.7	27.3 ± 11.8	69	24.8 ± 5.2	1.8	18.5 ± 3.4	56.3
<i>Pseudocalanus elongatus</i>	61.1 ± 25.6	4.7	2 ± 1.7	5.3	164 ± 48.0	8.9	3.1 ± 1.3	8.8
<i>Paracalanus parvus</i>	134.3 ± 13.7	12.1	0.9 ± 1.2	3	137 ± 5.2	9.4	1 ± 0.3	3.4
<i>Centropages ponticus</i>	33.3 ± 8.9	3.0	0.4 ± 1.2	1.2	69 ± 22.8	3.8	0.8 ± 0.3	2.1
<i>Oithona davisae</i>	116.3 ± 17.5	10.2	0.5 ± 1.1	1.5	176 ± 43.6	10.1	0.8 ± 0.2	2.6
<i>Oithona similis</i>	273 ± 146.3	20.9	1.1 ± 1.5	2.7	309.4 ± 63.1	19.6	1.2 ± 0.3	4
Науплиусы	252.2 ± 90.6	20.0	0.2 ± 1.1	0.5	503.4 ± 83.3	31.7	0.3 ± 0.1	1
Copepoda								
Сумма Copepoda	1123.5 ± 321.2	91.4	36 ± 12.6	93.1	1483.7 ± 226.1	90.6	26.9 ± 4.2	82.2
<i>Penilia avirostris</i>	1.1 ± 0.7	0.1	<0.1	0.1	1.3 ± 0.9	0.1	<0.1	0.1
<i>Parasagitta setosa</i>	3.8 ± 1.4	0.3	0.7 ± 1.4	1.6	6.1 ± 1.4	0.4	1.6 ± 0.5	5.9
<i>Oikopleura (Vexillaria) dioica</i>	68.5 ± 38.1	5.8	1.6 ± 1.8	4.7	129.4 ± 31.3	7.7	3.3 ± 0.8	11.4
Bivalvia	0	0	0	0	3.4 ± 2.3	0.2	<0.1	0
Меропланктон	4.1 ± 2.9	0.5	0.1 ± 1.02	0.2	12.2 ± 4.0	0.7	0.1 ± 0.0	0.3
Общий мезопланктон	1216.5 ± 312.3	—	38.5 ± 12.9	—	1642.8 ± 252.7	—	32 ± 4.2	—

копеподы *C. euxinus* и была выше в западном секторе, чем в восточном (табл. 2). Биомасса копеподы *O. similis* и науплиусов в исследуемом районе моря не превышала 5%. Вместе с тем обнаружилось, что виды, казалось бы, имеющие минорное представительство среди других организмов мезозoopланктона (*O. dioica* и *Parasagitta setosa*), вносили весьма существенный вклад в биомассу, особенно в восточном секторе моря.

Из данных табл. 2 следует, что и биомасса, и доля отдельных таксонов в мезозoopланктоне западного и восточного глубоководных секторов моря существенно не различались ($p > 0.05$). Это означает, что по крайней мере по трофической компоненте условия существования популяции *M. leidy* в обоих этих секторах в октябре 2019 г. были практически идентичны.

Хищнический пресс гребневики *M. leidy* на популяции мезозoopланктона. По составу жертв и их относительному количеству в гастральной полости исследованные особи гребневики *M. leidy* на западе и востоке различались несущественно. Однако на западе в пище гребневики была выше доля копеподы *C. euxinus*, а на востоке *O. similis* не встречалась среди жертв (рис. 5).

Основными компонентами пищи гребневики *M. leidy* были копеподы *Acartia* spp. и *O. davisae*

и их науплиусы. На долю *C. euxinus* приходилось до 13% численности всех жертв в восточном секторе, и только 5% в западном. Численность аппендикулярий в пище гребневики *M. leidy* повсеместно составляла не более 9%, других групп мезозoopланктона — не более 5%.

При очевидной неспособности ювенильных особей *M. leidy* поедать крупных представителей мезозoopланктона, гребневики с орально-аборальной длиной 20–47 мм, составлявшие основную часть популяции в октябре 2019 г., не различались по своей селективности питания. Уже при длине < 20 мм в пище гребневики нередко наблюдались поздние возрастные стадии щетинкочелюстных *P. setosa* и копеподы *C. euxinus*. Причем последний вид в 40% случаев присутствовал среди жертв *M. leidy* и в светлое время суток. Различные виды мелкоразмерного мезозoopланктона также им активно потреблялись, а отсутствие науплиусов копепод в его гастральной полости (ГП), возможно, обусловлено их быстрым перевариванием. В то же время в популяции *M. leidy* присутствовали особи (чаще на личиночной или постличиночной стадии развития), не имеющие пищи в ГП. Их доля в западном и восточном глубоководных секторах моря достигала 14 и 22% соответственно (табл. 3).

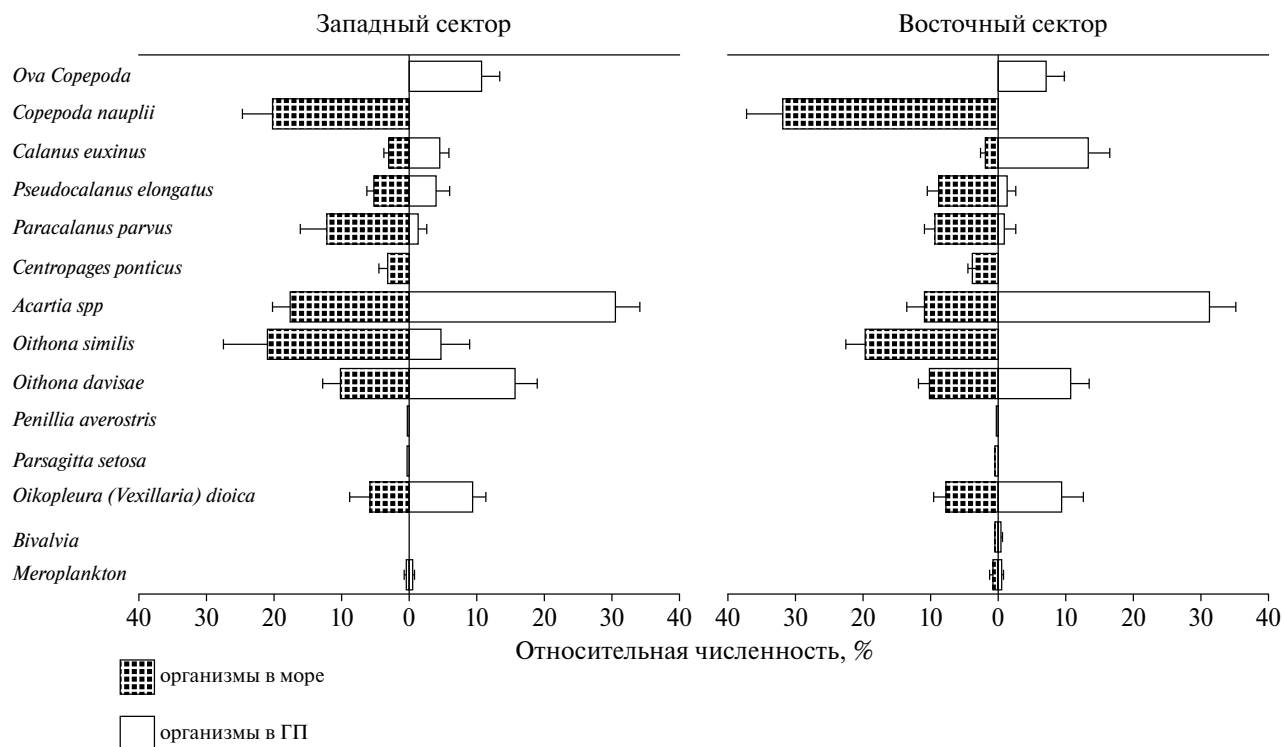


Рис. 5. Численный состав массового мезопланктона (%) в западном и восточном глубоководных секторах Черного моря и доля этих организмов (%) в пище *M. leidyi* из тех же районов в октябре 2019 г.

Из полученных данных следует, что гребневик *M. leidyi* потреблял больше пищи в восточном секторе ($p < 0,05$), где его рацион составлял в среднем 0.40 ± 0.06 мг С экз.⁻¹ сут.⁻¹, тогда как в западном секторе — 0.26 ± 0.06 мг С экз.⁻¹ сут.⁻¹.

По отношению к $C_{\text{орг}}$ тела скорость питания особей в обоих секторах (9.33 ± 0.19 и $12.17 \pm 1.76\%$ сут.⁻¹ на западе и востоке соответственно) достоверно не различалась ($p > 0.05$), что было вызвано относительно большей длиной и массой тела питающихся особей на востоке. Размеры удельного суточного рациона гребневика существенно зависели от состава пищи: рацион обычно был ниже (0.16–4.3%) в случае мелкоразмерных жертв (*O. davisae*, *P. avirostris*, *O. dioica*, *P. parvus*, яйца Copepoda), и выше (до 60% С тела) при потреблении *M. leidyi* копеподы *C. euxinus*.

Объем воды, освобожденной гребневику от организмов, строго зависел от массы и, соответственно, содержания $C_{\text{орг}}$ в его теле (табл. 4). При потреблении одноразмерными особями *M. leidyi* копепод *Acartia* spp., *C. euxinus* и *O. davisae* он изменялся слабо, что указывает на близкую эффективность их улавливания этим видом. Для особей с массой тела 5 г (~25 мм) облавливаемый объем воды достигал ~20 л экз.⁻¹ сут.⁻¹, для 10 г особей (~40 мм) — около 40 л экз.⁻¹ сут.⁻¹. Со значительно

меньшей скоростью потреблялась *O. dioica*, что могло быть связано с узкой глубинной зоной (область термоклина) распределения этого вида, а также маскирующим влиянием более плотных и гетерогенных скоплений рачкового мезозoopланктона.

Сравнение количества усвоенной пищи (А, мг С экз.⁻¹ сут.⁻¹) с минимальными пищевыми потребностями гребневика, рассчитанными по скорости дыхания (Q, мг С экз.⁻¹ сут.⁻¹), показало, что ассимилированная часть рациона *M. leidyi* во всех случаях компенсировала эти траты. Причем ювенильные возрастные стадии питались значительно эффективнее ($A/Q = 2.2$ и 3.2 на западе и востоке соответственно), чем взрослые особи ($A/Q = 1.3$ в обоих глубоководных секторах). Это означает, что соматический рост молоди *M. leidyi* осенью 2019 г. был достаточно хорошо обеспечен, тогда как генеративная активность взрослых особей в это время могла быть отчасти ресурсно ограниченной. Однако из-за сдерживающего влияния низкой температуры на генеративные процессы данное обстоятельство могло уже и не иметь большого значения для выживания популяции гребневика в осенне-зимний период.

Зависимое от многих факторов (состав, биомасса, распределение организмов и пр.) ежесуточное выедание гребневику *M. leidyi* массовых видов

мезозoopланктона в западном и восточном глубоководных секторах моря колебалось в пределах 1.5–11.0% биомассы потенциальных жертв (рис. 6).

Хищнический пресс *M. leidy* был несколько слабее на западе (1.6–5.2% биомассы) и сильнее на востоке (1.5–11.0% биомассы), причем три вида копепод выедались гребневиком почти одинаково эффективно (4.5–11% биомассы), в то время как *O. dioica* была подвержена этому в значительно меньшей степени (1.5–1.6%). В целом в глубоководных районах Черного моря вследствие хищничества гребневика ежесуточные потери кормового мезозoopланктона были близки к 2–4% его биомассы. При удельной суточной продукции планктонных ракообразных, равной 10% биомассы, хищнический пресс *M. leidy* в изученных районах мог составлять около 20–40% суточной продукции мезозoopланктона и не должен был привести к снижению биомассы потребляемых организмов. Вместе с тем для отдельных тепловодных или умеренноводных видов, а также районов их обитания хищничество гребневика могло представлять более серьезную угрозу. Так, не исключено, что выедание этим хищником копеподы *Acartia* spp. в восточном глубоководном секторе моря в октябре 2019 г. уже превышало потенциал суточного восполнения (10% биомассы) популяции рачка.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При многолетней тенденции постепенного повышения температуры на поверхности Черного моря (в среднем на 2°C в теплый период года за последние 20 лет (Новикова, Полонский, 2018)) этот процесс имеет значительную межгодовую вариабельность, в частности приведшую к тому, что температура поверхности моря (ТПМ) в январе – феврале 2019 г. оказалась приблизительно на 1°C выше, чем в среднем за аналогичный период 2003–2018 гг. Кроме того, согласно открытым базам данных (<http://disc.sci.gsfc.nasa.gov/giovanni>) ТПМ в январе 2019 г. была на 1–1.5°C выше, чем в январе 2017–2018 гг. Поскольку рост ТПМ в зимние месяцы сопровождается ослаблением конвективного перемешивания ХПС (Иванов, Белокопытов, 2011), его температура также сохраняется более высокой, а содержание в нем кислорода снижается. В 2019 г. температура в ядре ХПС составляла 8.3–8.4°C, насыщенность этих вод кислородом – 60–65% (Видничук, Коновалов, 2021). Такие внешние условия могли не только замедлить развитие популяций холодноводных видов мезозoopланктона (особенно *C. euxinus*), а также, возможно, выживаемость гребневика *B. ovata* в зимний период, но и косвенно повлиять на состояние пелагической биоты. Очевидный механизм этого влияния – конвективное перемешивание ХПС, при ослаблении которого блокируется вертикальный перенос

Таблица 3. Трофозоологические характеристики гребневика *M. leidy* в западном и восточном глубоководных секторах Черного моря в октябре 2019 г.

Параметр	Западный сектор	Восточный сектор
Исследовано особей, экз.	48	49
Длина тела особей, мм	33.0 ± 1.9	30.9 ± 1.9
Количество жертв в ГП, инд. экз. ⁻¹	9.9 ± 1.2	8.6 ± 1.9
Доля особей, не имеющих пищи в ГП, %	14.0	22.2
Суточный рацион, мг С экз. ⁻¹	0.26 ± 0.06	0.40 ± 0.06
Удельный суточный рацион, %	12.17 ± 1.76	9.33 ± 0.19

Таблица 4. Параметры степенной зависимости $F_{sp} = a \cdot C^b$ облавливаемого объема морской воды (F_{sp} , л мг С⁻¹ сут.⁻¹) от содержания углерода в теле *M. leidy* (C, мг⁻¹) при потреблении гребневиком четырех видов зоопланктона в Черном море осенью 2019 г. n – число измерений, r^2 – коэффициент детерминации

Вид	n	a	b	r^2
<i>Acartia</i> sp.	79	17.18	–0.94	0.41
<i>Calanus euxinus</i>	31	16.37	–0.83	0.57
<i>Oithona davisae</i>	39	22.70	–1.04	0.52
<i>Oikopleura (Vexillaria) dioica</i>	30	6.57	–1.10	0.71

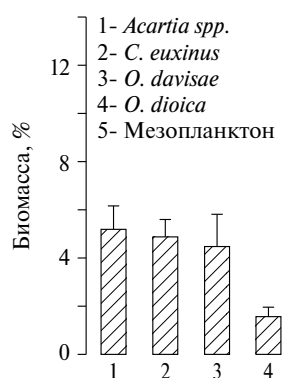


Рис. 6. Суточные потери биомассы (%) некоторых массовых видов и мезозoopланктона в целом в результате хищничества популяции *M. leidy* в западном и восточном глубоководных секторах Черного моря в октябре 2019 г.

биогенных элементов из слоя основного пикноклина в зону активного фотосинтеза, в результате чего с весенним потеплением фитопланктон развивается слабее, чем обычно (Востоков и др., 2019). Соответственно, сообщества мезозоопланктона, а затем и хищных планктофагов в этом случае также не всегда могут иметь достаточные ресурсы для своего развития.

Биомасса копеподы *C. euxinus*, достигавшая в глубоководных районах Черного моря в октябре 2005 г. $6.2 \pm 1.1 \text{ г м}^{-2}$, октябре 2016 г. — $7.1 \pm 0.7 \text{ г м}^{-2}$ и ноябре 2017 г. — $7.3 \pm 0.5 \text{ г м}^{-2}$ (Губарева, Аннинский, 2022), в октябре 2019 г. сократилась до $2.7 \pm 0.7 \text{ г м}^{-2}$ (Дацык и др., 2020). Почти в пять раз за это время снизилась биомасса субдоминирующих копепод *P. elongatus* и *A. clausi*. В то же время при общем двукратном снижении биомассы мезозоопланктона его суммарная численность не только не уменьшилась, но даже в 1.5 раза возросла, преимущественно за счет мелких циклопоидных рачков, таких как *O. davisae* и *O. similis* (Дацык и др., 2020). Следовательно, наряду с наблюдаемыми количественными изменениями в мезозоопланктонных сообществах, возможно вызванными потеплением, качественно изменилась в последние годы и структура этих сообществ.

Для сообщества желтелых хищников в 2000–2017 гг. было характерно постепенное нарастание в глубоководной части моря биомассы медузы *A. aurita* с 44 до 634 г м^{-2} и гребневика *B. ovata* с 4 до 28 г м^{-2} (Anninsky *et al.*, 2022). В то же время биомасса гребневика *M. leidy* в этот период скорее снижалась с 76 до 23 г м^{-2} (Anninsky *et al.*, 2022). В 2018–2019 гг. развивающиеся в этом направлении желтелые комплексы достигли определенного предела, и изменения в них приняли турбулентный характер: биомасса *A. aurita* сократилась с 634 до 98 г м^{-2} , *B. ovata* — с 28 до $< 1.0 \text{ г м}^{-2}$, а биомасса *M. leidy* возросла приблизительно пятикратно. Нет достаточных оснований считать, что её увеличение до 144 г м^{-2} у последнего вида может быть предвестником возобновившейся в Черном море экспансии этого хищника. Во-первых, увеличение биомассы у *M. leidy* (при практическом отсутствии контроля за ней со стороны гребневика *B. ovata*) выглядит ничтожным на фоне того, как она может возрастать сезонно (Finenko *et al.*, 2013), а также аномально высоких значений ($> 1000 \text{ г м}^{-2}$), которых она достигала в Черном море в конце 80-х — начале 90-х гг. прошлого столетия (Vinogradov *et al.*, 1999). Во-вторых, прирост биомассы *M. leidy* в 4–5 раз по сырому веществу и в 5–6 раз по органическому уступал ее синхронной потере у своего главного трофического конкурента — медузы *A. aurita*. В-третьих, интенсивность размножения *M. leidy* при, казалось бы, позитивных изменениях в его популяции, по-видимому, весь прошедший год оставалась крайне низкой.

Это дает основание заключить, что обеспеченность пищей гребневика в основном сохранялась в 2019 г. на уровне немногим превышающем пищевые потребности, необходимые для компенсации метаболических трат. То, что полевые оценки рациона гребневика *M. leidy* не подтвердили явную скудость его питания в октябре 2019 г., не означает, что в той же мере пищи ему хватало летом или в начале осени. Само состояние популяции гребневика однозначно свидетельствовало об обратном. Так как в глубоководных районах осенью 2019 г. среди жертв этого хищника доминировали копеподы *C. euxinus*, составлявшие около 80% общей биомассы потребленных организмов, можно предположить, что ранее при температуре верхнего перемешанного слоя, превышающей 20°C , доля этого вида в рационе *M. leidy* была значительно ниже. Такой вывод следует из очевидного разграничения предпочитаемых биотопов обоих видов: копепода *C. euxinus* — холодноводный вид, мигрирующая часть популяции которого летом практически не поднимается выше зоны термоклина (Svetlichny, Hubareva, 2009), тогда как гребневик *M. leidy* — вид тепловодный, основная часть популяции которого постоянно находится в зоне ВКС (Vinogradov *et al.*, 1999). Не исключено также, что высокие концентрации мелкой циклопоидной копеподы *O. davisae*, населяющей верхнюю эпипелагиаль, могли летом дезориентировать гребневика, однако не обеспечили его пищевые потребности в должной мере.

С понижением температуры ниже 20°C осенью 2019 г. мезозоопланктона в ВКС стало больше и вероятность его потребления *M. leidy* возросла, о чем говорит относительно небольшое количество особей, не имевших пищи в гастральной полости. Заметим, что летом 2017 г., на пике развития гребневика в глубоководных районах Черного моря, на долю таких особей приходилось 25–50% всей численности *M. leidy*, а на шельфе Севастополя до 40% (Finenko *et al.*, 2013). О благоприятных пищевых условиях для гребневика *M. leidy* в глубоководной зоне Черного моря в октябре 2019 г. говорит и значительное количество жертв в ГП (8.6 ± 0.8 экз. инд.⁻¹), тогда как летом 2017 г. их было вдвое меньше (Finenko *et al.*, 2022). Следует учитывать, что различия в количестве жертв могли быть связаны также и с разной размерной структурой популяции гребневика в эти годы. Летом 2017 г. в популяции *M. leidy* численно доминировали (80%) ранневозрастные особи длиной $< 5\text{--}15 \text{ мм}$, а осенью 2019 г. — крупноразмерные взрослые экземпляры (70%). В экспериментах, когда *M. leidy* были предложены науплиусы *Artemia salina*, 20–30-мм особи потребляли 1–17 экз. а 40–50-мм за то же время уже 7–70 экз. (Финенко и др., 2005). Кроме того, наличие жертв в ГП может зависеть от их таксономической принадлежности, размеров

и морфологии. Быстрее всего (до 2 мин) *M. leidy* переваривает инфузорий, науплиусов копепод (2–6 мин), медленнее (2–3 часа) – взрослых особей и старших копеподитов *C. euxinus* (Цихон-Луканина и др., 1995; Sullivan, 2010).

При изменении концентрации мезозoopланктона в пределах ее естественной изменчивости объем воды, освобожденный гребневиком от кормовых организмов, может колебаться от единиц до десятков литров в час в зависимости от распределения и поведенческих реакций потенциальных жертв и самого хищника. Наиболее эффективно *M. leidy* потребляет медленно движущийся мезопланктон (велигеры моллюсков и науплиусы усконогих раков), тогда как копеподы, способные избегать гребневика, улавливаются им с меньшей эффективностью (Finenko *et al.*, 2018b). Приблизительно равный освобождаемый объем, полученный при потреблении гребневиком копепод *Acartia* sp., *C. euxinus*, *O. Davisae*, и меньший – при выедании аппендикулярии *O. dioica*, может означать, что эти копеподы оказались для гребневика одинаково доступны, тогда как аппендикулярии, населяющие исключительно область термоклина, – доступны менее.

Степень выедания гребневиком в октябре 2019 г. копеподы *Acartia* sp. в восточном секторе моря (~11% биомассы в сутки) несколько превышала обычный потенциал восстановления популяции этого рачка (10% биомассы в сутки). Для копепод *C. euxinus*, *O. davisae* и аппендикулярии *O. dioica*, которые ежедневно выедались *M. leidy* на 1.5–8.0%, хищничество гребневика уже, по-видимому, не имело существенного влияния на ход популяционной динамики. Этот вывод справедлив и в отношении всего мезозoopланктона, биомасса которого ежедневно выедалась гребневиком лишь на 2–4%. Необходимо отметить, что в период исследований популяция гребневика *M. leidy* находилась на пике своего сезонного развития, когда влияла на мезозoopланктон особенно сильно. В конце 80-х – начале 90-х гг. прошлого столетия хищничество гребневика *M. leidy* привело к резкому сокращению биомассы всего кормового мезозoopланктона и даже исчезновению таких копепод, как *Oithona nana* и, вероятно, *Labidocera brunescens*. Летом 2008 г. на шельфе Черного моря *M. leidy* ежедневно выедал 17% биомассы копепод и 40% велигеров моллюсков; в 2009 и 2013–2014 гг. – до 5% копепод и 3% всей численности велигеров соответственно (Finenko *et al.*, 2018b). Очевидно, что степень влияния гребневика *M. leidy* на мезозoopланктон имеет тенденцию к снижению в последние годы, и после натурализации в Черном море гребневика *B. ovata* развитие мезозoopланктонного комплекса здесь в большей мере регулируется температурным режимом вод, обогащением фотического слоя биогенными

элементами и концентрацией хлорофилла в верхней эпипелагиали (Vereshchaka *et al.*, 2019).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Довольно длительный период экспансии медузы *A. aurita* (2003–2017) в экосистеме Черного моря сменился в 2018–2019 гг. турбулентными изменениями в планктоне: в глубоководных районах биомасса кормового мезозoopланктона сократилась вдвое, *A. aurita* – в 4–5 раз, гребневика *B. ovata* – не менее чем в 25 раз, а *M. leidy*, наоборот, возросла от 23–48 г м⁻² осенью 2016–2017 гг. до 144 ± 21 г м⁻² – в октябре 2019 г. Однако на фоне биомассы, которой *M. leidy* достигал в конце 80-х – начале 90-х гг. прошлого столетия, ее прирост в 2019 г. нельзя признать значительным. Несмотря на преобладание в популяции гребневика крупных половозрелых особей (≥ 30 мм) (до 25% общей численности), интенсивность их размножения была крайне низкой, на что указывает небольшая численность личинок и отсутствие яиц. Удельный суточный рацион изменялся от 4 до 13% углерода тела у взрослых и ювенильных особей соответственно и превышал минимальные потребности гребневика в пище. Ежедневное потребление *M. leidy* кормового мезозoopланктона варьировало в пределах 1.5–11% его биомассы. Три вида копепод (*Acartia* spp., *C. euxinus*, *O. davisae*), доминировавшие в мезозoopланктоне моря и пище гребневика, выедались им с близкой эффективностью (4.5–11% биомассы), в то время как аппендикулярия *O. dioica* – в значительно меньшей степени (1.5–1.6% биомассы). Скорость выедания *M. leidy* всего кормового мезозoopланктона в глубоководной части Черного моря в октябре 2019 г. была близка к 2–4% биомассы организмов в сутки и не могла существенно повлиять на структуру и обилие мезозoopланктонных сообществ. Тем не менее *M. leidy* по-прежнему остается значимым элементом в сообществе хищных планктофагов, способным при благоприятных условиях сезонно или локально регулировать развитие отдельных популяций копепод и мезозoopланктонного комплекса в целом.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа подготовлена по теме государственного задания ФИЦ “Институт биологии южных морей” “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом” НИОКТР (номер гос. регистрации 121041400077-1).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аболмасова Г.И. Скорость энергетического обмена у *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz в зависимости от температурных и пищевых условий // Гидробиол. журн. 2001. Т. 37. № 2. С. 90–95.
- Видничук А.В., Коновалов С.К. Изменение кислородного режима глубоководной части Черного моря за период 1980–2019 годы // Морск. гидрофиз. журн. 2021. Т. 37. № 2. С. 195–206. <https://doi.org/10.22449/0233-7584-2021-2-195-206>
- Востоков С.В., Лобковский Л.И., Востокова А.С., Соловьев Д.М. Сезонная и многолетняя изменчивость фитопланктона в Черном море по данным дистанционного зондирования и контактными измерениями хлорофилла а // Докл. акад. наук. 2019. Т. 485. № 1. С. 99–103. <https://doi.org/10.31857/S0869-5652485199-103>
- Губарева Е.С., Аннинский Б.Е. Состояние популяции *Calanus euxinus* (Copepoda) в открытой пелагиали и зоне шельфа Черного моря осенью 2016 г. // Морск. экол. журн. 2022. Т. 7. № 3. С. 17–27. <https://marine-biology.ru/mbj/article/view/349>
- Дацык Н.А., Аннинский Б.Е., Финенко Г.А. Зоопланктон глубоководных районов Черного моря в осенний период 2019 г. // Экол. проблемы. Взгляд в будущее: Сб. тр. IX Междунар. науч.-практ. конф., БП и СОТ «Витязь» – БП и СОТ «Лиманчик», 22–23 октября 2020 г. / Под ред. Ю.А. Федорова. Таганрог: Изд-во Южного федерального университета, 2020. С. 201–205.
- Загородняя Ю.А., Драпун И.Е., Галаговец Е.А., Гарбазей О.А., Губанов В.В., Кудякова А.С., Литвинюк Д.А., Попова Е.В. Сезонные изменения численности, биомассы и видового разнообразия зоопланктона в открытом море у берегов Крыма (Черное и Азовское моря) // Океанология. 2023. Т. 63. № 2. С. 255–265. <https://doi.org/10.31857/S0030157423010173>
- Иванов В.А., Белокопытов В.Н. Океанография Черного моря. Севастополь: МГИ НАН Украины, 2011. 209 с.
- Новикова А.М., Полонский А.Б. Междесятилетняя изменчивость температуры поверхности и холодного промежуточного слоя в Черном море // Системы контр. окруж. среды. 2018. № 14. С. 110–115. <https://doi.org/10.33075/2220-5861-2018-4-110-115>
- Финенко Г.А., Романова З.А. Популяционная динамика и энергетика гребневика *Mnemiopsis leidyi* // Океанология. 2000. Т. 40. № 5. С. 720–728.
- Финенко Г.А., Романова З.А., Аболмасова Г.И., Аннинский Б.Е., Губарева Е.С., Бат Л., Кидейс А.Е. Влияние условий питания на скорость потребления и переваривания пищи у лопастного гребневика *Mnemiopsis leidyi* // Морск. экол. журн. 2005. Т. 4. № 1. С. 75–83.
- Финенко Г.А., Аннинский Б.Е., Дацык Н.А. Пространственное распределение, структура популяций желетелых хищников и пищевой пресс на зоопланктонное сообщество в прибрежных районах Крымского побережья Черного моря // Журн. сиб. федер. ун-та. Биология. 2021. 14 (2). С. 168–181. <https://doi.org/10.17516/1997-1389-0336>
- Цихон-Луканина Е.А., Резниченко О.Г., Лукашева Т.А. Питание гребневика мнемииопсиса // Рыбное хозяйство. 1995. № 4. С. 46–47.
- Alexandrov B., Arashkevch E., Gubanova A., Korshenko A. Black Sea Monitoring Guidelines – Mesozooplankton // EU/UNDP Project: Improving Environmental Monitoring in the Black Sea (EMBLAS). Final draft. October 2014. P. 1–31.
- Anninsky B.E., Finenko G.A., Datsyk N.A., Hubareva E.S. Expansion of gelatinous macrozooplankton in the open Black Sea off Crimea under the weather events of recent years // Medit. Mar. Sci. 2022. V. 23. Iss. 3. P. 460–472. <https://doi.org/10.12681/mms.27021>
- Anninsky B.E., Finenko G.A., Datsyk N.A. Interannual Population Dynamics of the Ctenophore *Beroe ovata* Bruguière, 1789 at the Outer Shelf of Sevastopol Bay of the Black Sea // Russian J. Biol. Inv. 2023. V 14. № 2. 131–143. <https://doi.org/10.1134/S2075111723020030>
- Arashkevich E.G., Stefanova K., Bandelj V., Siokou S., Kurt T.T., Orek J.A., Timofte F., Timonin A., Solidoro C. Mesozooplankton in the open Black Sea: Regional and seasonal characteristics // J. Mar. Syst. 2014. V. 135. P. 81–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmarsys.2013.07.011>
- Boersma M., Malzahn A.V., Greve W., Javidpour J. The first occurrence of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* in the North Sea // Helgoland. Mar. Res. 2007. V. 61. № 2. P. 153–155. <https://doi.org/10.1007/s10152-006-0055-2>
- Condon R.H., Duarte C.M., Pitt K.A., Robinson K. Recurrent jellyfish blooms are a consequence of global oscillation // Proc. Natl. Acad. Sci. 2013. V. 110. P. 1000–1005. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210920110>
- Delpy F., Albouy-Boyer S., Pagano M., Thibault D., Blanchot J., Guilhaumon F., Molinero J.C., Bonnet D. Identifying the drivers of abundance and size of the invasive ctenophore *Mnemiopsis leidyi* in Northwestern Mediterranean lagoons // Mar. Environ. Res. 2016. V. 119. P. 114–125. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.05.026>
- Dinasquet J., Titelman J., Möller L.F., Setälä O., Granhag L., Andersen T., Båmstedt U., Haraldsson M., Hossia A., Katajisto T., Kragh T., Kuparinen J., Schröter M.-L., Søndergaard M., Tiselius P., Riemann L. Cascading effects of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* on

- the planktonic food web in a nutrient-limited estuarine system // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2012. V. 460. P. 49–61. <https://doi.org/10.3354/meps09770>
- Finenko G.A., Abolmasova G.I., Romanova Z.A., Datsyk N.A., Anninsky B.E. Population Dynamics of the Ctenophore *Mnemiopsis leidyi* and Its Impact on the Zooplankton in the Coastal Regions of the Black Sea off the Crimean Coast in 2004–2008 // *Oceanolog.* 2013. V. 53. Iss. 1. P. 80–88. <https://doi.org/10.1134/S0001437012050074>
- Finenko G.A., Anninsky B.E., Datsyk N.A., *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 (Ctenophora: Lobata) in the inshore areas of the Black Sea: 25 years after its outbreak // *Russian J. Biol. Inv.* 2018a. V. 5. № 1. P. 86–93. <https://doi.org/10.1134/S2075111718010071>
- Finenko G.A., Anninsky B.E., Datsyk N.A. Trophic Characteristics of *Mnemiopsis leidyi* and Its Impact on the Planktonic Community in the Black Sea Inshore Regions // *Oceanolog.* 2018b. V. 58. Iss. 6. P. 817–824. <https://doi.org/10.1134/S0001437018060048>
- Finenko G.A., Anninsky B.E., Datsyk N.A. Ctenophore *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 Population and Its Impact on Zooplankton in Open Areas of the Black Sea in July–August 2017 // *Russian J. Biol. Inv.* 2022. V. 13. № 3. P. 361–375. <https://doi.org/10.1134/S2075111722030055>
- Ghabooli, S., Shiganova T.A., Zhan A., Cristescu M., Eghtesadi–Araghi P., MacIsaac H. Multiple introductions and invasion pathways for the invasive ctenophore *Mnemiopsis leidyi* in Eurasia // *Biol. Inv.* 2011. V. 13. P. 679–695. <https://doi.org/10.1007/s10530-010-9859-8>
- Gubanova A.D., Prusova I. Yu., Niermann U., Shadrin N.V., Polikarpov I.G. Dramatic change in the Copepod Community in Sevastopol Bay (Black Sea) during two decades (1976–1996) // *Senckenbergiana maritima.* 2001. V. 31. P. 7–27.
- Ivanov V.P., Kamakin A.M., Ushivtsev V.B., Shiganova T.A., Zhukova O.P., Aladin N.V., Wilson S.I., Harbison G.R., Dumont H.J. Invasion of the Caspian Sea by the comb jellyfish *Mnemiopsis leidyi* (Ctenophora) // *Biol. Inv.* 2000. V. 2. P. 255–258.
- Javidpour J., Sommer U., Shiganova T. First record of *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz 1865 in the Baltic Sea // *Aquat. Invasions.* 2006. V. 1. № 4. P. 299–302.
- Kideys A.E. Fall and rise of the Black Sea ecosystem // *Science.* 2002. V. 297. Iss. 5586. P. 1482–1484. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1073002>
- Konsulov A., Kamburska L. Ecological determination of the new ctenophore (*Beroe ovata*) invasion in the Black Sea // *Inst. Oceanol.* 1998. V. 2. P. 195–197.
- Mutlu E. Recent distribution and size structure of gelatinous organisms in the southern Black Sea and their interactions with fish catches // *Mar. Biol.* 2009. V. 156. P. 935–957. <https://doi.org/10.1007/s00227-009-1139-8>
- Purcell J.E., Uye S.I., Lo W.T. Anthropogenic causes of jellyfish blooms and direct consequences for humans: a review // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2007. V. 350. P. 153–174. <https://doi.org/10.3354/meps07093>
- Shiganova T., Mirzoyan Z., Studenikina E., Volovik S., Siokou-Frangou I., Zervoudaki S., Christou E.D., Skirta A.Y., Dumont H.J. Population development of the invader ctenophore *Mnemiopsis leidyi*, in the Black Sea and in other seas of the Mediterranean basin // *Mar. Biol.* 2001. V. 139. P. 431–445.
- Shiganova T.A., Sommer U., Javidpour J., Molinero J.C., Malej A., Kazmin A.S., Isinibilir M., Christou E., Siokou-Frangou I., Marambio M., Fuentes V., Mirzoyan Z.A., Gülsahin N., Lombard F., Lilley M.K.S., Angel D.L., Galil B.S., Bonnet D., Delpy F. Patterns of invasive ctenophore *Mnemiopsis leidyi* distribution and variability in different recipient environments of the Eurasian seas: A review // *Mar. Environ. Res.* 2019. P. 0141–1136. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.104791>
- Studenikina E., Volovik S.P., Mirzoyan I.A., Luts G.I. The ctenophore *Mnemiopsis leidyi* in the Sea of Azov // *Oceanolog.* 1991. V. 31. Iss. 6. P. 722–725.
- Svetlichny L.S., Hubareva E.S. Energy allocation and development patterns in *Calanus euxinus* (Copepoda) // *Trophic Relationships and Food Supply of Heterotrophic Animals in the Pelagic Ecosystem of the Black Sea* / Eds Ozturk B., Kideys A., Finenko G.A., Shulman G.E., Bat L. Black Sea Commission Publications 2009–2. Istanbul, Turkey, 2009. 308 p.
- Sullivan Y.J. Gut evacuation of larval *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz (Ctenophora. Lobata) // *J. Plankton Res.* 2010. V. 32. № 1. P. 69–74. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp100>
- Vinogradov M.E., Shushkina E.A., Musaeva E.I., Sorokin P.Y. A newly acclimated species in the Black Sea: the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* (Ctenophora: Lobata) // *Oceanolog.* 1989. V. 29. Iss. 2. P. 220–224.
- Vinogradov M.E., Shushkina E.A., Mikaelyan A.S., Nezhlin N.P. Temporal (seasonal and interannual) changes of ecosystem of the open waters of the Black Sea. // *Environmental Degradation of the Black Sea: Challenges and Remedies* / S. Besiktepe, U. Unluata, A.S. Bologa (Eds.). Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 1999. V. 56. P. 109–129.
- Vereshchaka A., Anokhina L., Lukasheva T., Lunina A. Long-term studies reveal major environmental factors driving zooplankton dynamics and periodicities in the Black Sea coastal zooplankton. *PeerJ* 2019. V. 7. e7588. <http://doi.org/10.7717/peerj.7588>

Mesozooplankton Communities in Deep-water Areas of the Black Sea: Are Their Composition and Biomass Regulated by the Ctenophore *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865?

© 2024 г. В. Е. Anninsky^{1, #}, G. A. Finenko¹, N. A. Datsyk¹

Federal Research Centre Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of the RAS, Sevastopol, 299011 Russia

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

The abundance, biomass, distribution and feeding patterns of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz 1865 were studied in the deep-water Black Sea in October 2019. The biomass of the ctenophore in the open areas of the sea was 100–200 g m⁻², the abundance was 16–38 ind. m⁻². With the dominance of large individuals (≥30 mm) in the population, the activity of their reproduction remained extremely weak. The specific daily ration varied from ~4% to 13% of body carbon in adults and juveniles, respectively, and exceeded the minimum food requirements of the ctenophore. The daily consumption of three species of copepods (*Acartia* spp., *Calanus euxinus*, *Oithona davisae*) by *M. leidyi* reached 4.5–11% of their biomass, while that of appendicularians *Oikopleura (Vexillaria) dioica* – < 1.6%. The predatory pressure of *M. leidyi* on the entire prey zooplankton attained 2–4% of the biomass of organisms per day.

Keywords: Black Sea, *Mnemiopsis leidyi*, copepods, food spectrum, daily ration, food requirements

РЕГИОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ СОСТОЯНИЯ ЧЕРНОМОРСКОГО ИХТИОПЛАНКТОНА В ПЕРИОД СМЕНЫ ВЕСЕННЕГО ГИДРОЛОГИЧЕСКОГО СЕЗОНА НА ЛЕТНИЙ

© 2024 г. П. С. Подрезова*, Т. Н. Климова*, А. А. Субботин*, И. В. Вдодович*, @, А. В. Завьялов*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр "Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН", просп. Нахимова, 2, Севастополь, 299011 Россия

@E-mail: vdodovich@mail.ru

Поступила в редакцию 30.05.2022 г.

После доработки 30.09.2022 г.

Принята к публикации 25.04.2023 г.

Представлены видовое разнообразие и пространственное распределение ихтиопланктона в прибрежных и открытых водах северной части Черного моря и юго-западной части Азовского моря в июне 2020 г. Видовое разнообразие и численность ихтиопланктона изменялись в соответствии с региональными условиями прогрева верхнего слоя моря в процессе формирования вертикальной термической структуры летнего типа. Наиболее благоприятные условия для выживания ихтиопланктона отмечены в открытых и прибрежных водах западного сектора исследований в начальной фазе летнего гидрологического сезона.

Ключевые слова: ихтиопланктон, видовое разнообразие, пространственное распределение, питание личинок рыб, Черное море, гидрологический режим.

DOI: 10.31857/S1026347024010118, **EDN:** LMSGDE

Сезонность океанологических процессов и явлений, влияя на изменение условий обитания и воспроизводство морских организмов, лежит в основе многих биологических циклов и определяет время наступления и длительность биологических сезонов, видовое разнообразие, численность, распределение, поведение и миграции различных гидробионтов, а также их взаимодействия в сообществах (Гершанович, Муромцев, 1982). Особенно ярко связь между биологическими и гидрологическими сезонами прослеживается в морях умеренных широт с выраженной изменчивостью гидрологического режима, к каковым относится и Черное море (Дехник, Павловская, 1979). Климатические изменения, наблюдаемые в последние десятилетия, оказали существенное влияние как на экосистему Черного моря в целом, так и его отдельных, прежде всего прибрежно-шельфовых, акваторий (Kubryakov *et al.*, 2016; Turan, Gürlek, 2016; Oguz, 2017). С начала 1990-х гг. в Черном море отмечаются устойчивые изменения в гидрологическом режиме и динамике вод, в параметрах гидрологических сезонов, в особенностях проявления региональных квазистационарных и нестационарных термодинамических образований (Белокопытов, 2017; Трошенко, Субботин, 2018; Трошенко и др., 2019; Морозов, Маньковская, 2020; Маркова и др.,

2021; Подымов и др., 2021). По данным экспедиционных исследований, с начала 2000-х гг. в северной части Черного моря отмечается постепенное увеличение видового разнообразия и численности летнего ихтиопланктона после деградации экосистемы конца 1980–90-х гг. Увеличилась доля икры и личинок прибрежных видов рыб в открытых водах шельфа. Наблюдается расширение устоявшихся сроков нереста тепловодных и умеренноводных видов рыб (Дехник, 1973; Белокопытов, 2017; Klimova, Podrezova, 2018; Климова и др., 2019, 2021; Klimova *et al.*, 2021).

Климатические изменения прежде всего отразились на состоянии ихтиопланктона в летний нерестовый сезон. При этом региональные условия прогрева верхнего слоя моря и формирования вертикальной термической стратификации летнего типа становятся основными лимитирующими факторами результативности нереста тепловодных видов рыб. Однако если выживание икры рыб в основном зависит от температуры воды в период развития, то выживание личинок — от обеспеченности их пищей и определяется совпадением сроков результативного нереста с максимумом развития кормового зоопланктона, а следовательно, состоянием первичной продукции в море в предшествующий гидрологический сезон (Павловская, 1963;

Cushing, 1969; Дехник, Павловская, 1979). Таким образом, сдвиги сроков начала нерестовых сезонов, в зависимости от региональных гидрологических условий в предшествующий период, могут иметь серьезные последствия для выживания рыб на ранних стадиях онтогенеза и повлиять на конечный успех пополнения будущих поколений природных популяций рыб (Houde, 1987; Leggett, Deblois, 1994; Ohlberger *et al.*, 2014; Auth *et al.*, 2017).

Целью настоящего исследования является сравнительный анализ состояния летнего ихтиопланктона в открытых и прибрежных районах Азово-Черноморского бассейна в условиях смены весеннего гидрологического сезона на летний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал собран в 113-м рейсе НИС “Профессор Водяницкий” с 4 по 30 июня 2020 г. в северной части Черного моря (на шельфе с глубинами < 200 м и на глубоководных участках с глубинами > 200 м), в юго-западной части Азовского моря, а также в прибрежной акватории г. Севастополя (с глубинами < 50 м) в экспедициях на судах малого флота ФИЦ ИнБЮМ. Сбор проб осуществляли в режиме вертикальных ловов обратно-конической сетью БР-80/113 и конической сетью ИКС-80, ячея сита 400 мкм, площадь входного отверстия 0.5 м². Вертикальные ловы на глубоководных станциях выполнялись от нижней границы кислородного слоя ($\delta_t = 16.2$) до поверхности, на шельфовых мелководных станциях — от дна до поверхности, а в прибрежной акватории Севастополя — в слое 0–10 м. Всего было отобрано 85 ихтиопланктонных проб (78 — в Черном море, из них 14 в прибрежной акватории Севастополя, и 7 проб в Азовском море). Ихтиопланктон фиксировался 4%-м раствором формалина и обрабатывался в стационарных условиях. Идентификацию ихтиопланктона проводили по (Дехник, 1973; Russell, 1976). *Видовые названия даны по (WoRMS..., 2021).*

Для выявления региональных отличий в видовом составе и пространственном распределении ихтиопланктона на обширной акватории северной половины Черного и Азовского моря были выделены отдельные сектора, соответствующие периодам исследований, отличающихся по гидрологическому режиму: центральный (4–15 июня) от м. Херсонес до Керченского пролива; Азовское море (17–18 июня); кавказский (19–22 июня) вдоль Кавказского побережья; западный (24–27 июня) от Каркинитского залива до г. Севастополя; прибрежная акватория Севастополя (9, 23 и 30 июня).

Большая часть исследований летнего ихтиопланктона северной части Черного моря выполнялась в период установившегося летнего гидрологического сезона. Ихтиопланктонная съемка июня 2020 г. выполнена на шельфе и в глубоководных

районах на обширной акватории северной части Черного моря на начальном этапе формирования летнего типа вертикальной термической стратификации, определяющей региональные особенности результативности нереста большинства тепловодных рыб.

Для сравнения состояния ихтиопланктонных комплексов в открытых водах западного сектора и прибрежных водах акватории Севастополя использовали показатели индексов разнообразия и видового сходства, предложенные (Sørensen, 1948; Константинов, 1969; Одум, 1986). Питание личинок рыб изучали по методике (Дука, Синюкова, 1976). Пищевые объекты идентифицированы по (Определитель фауны..., 1969).

Для анализа гидрологического режима использовали экспедиционные данные вертикальных зондирований гидролого-гидрохимическим комплексом Indronaut Os 320 Plus. В качестве дополнительной информации о пространственно-временной изменчивости температуры и циркуляции поверхностных вод использовались космические снимки температуры поверхности моря (ТПМ) и расчетные карты геострофических течений за период с декабря 2019 по июль 2020 г. (Морской портал..., 2021).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гидрологический режим. Анализ доступной информации за время выполнения исследований и предшествующий период показал, что временные параметры съемки соответствовали переходной фазе от весеннего гидрологического сезона к летнему. Сезонный прогрев верхнего слоя моря начался с 11–12°C в конце апреля, и к началу исследований ТПМ в прибрежных и открытых водах Крыма увеличилась до 16.0–16.5°C и до 17.5–18.0°C — у берегов Кавказа (рис. 1а).

Термическая структура вод, благоприятная для начала нереста тепловодных видов рыб (Дехник, Павловская, 1979), сформировалась только в третьей декаде июня. К концу съемки большая часть исследуемой акватории прогрелась до 23–24°C и лишь в юго-восточной части — до 24.5–25.0°C (рис. 1б). На фоне запаздывания летнего гидрологического сезона и активизации ветро-волновой деятельности толщина верхнего квазиоднородного слоя (ВКС) варьировала от 1 до 10 м в зависимости от времени выполнения станций на фоне неравномерного прогрева верхнего слоя моря и региональных особенностей проявления атмосферных процессов.

Соленость поверхностных вод в различных частях исследуемой акватории изменялась от 16.9 до 18.7‰. При этом максимальные значения солености (18.2–18.7‰) соответствовали открытым

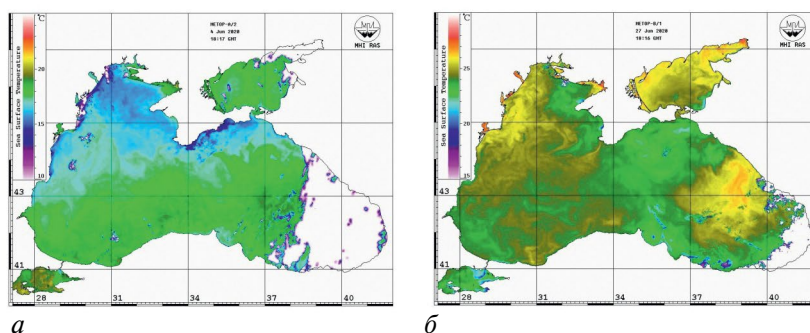


Рис. 1. Спутниковые карты распределения ТПМ на начало и окончание ихтиопланктонных исследований в июне 2020 г.: а – 04.06.2020; б – 27.06.2020 (Морской портал..., 2021).

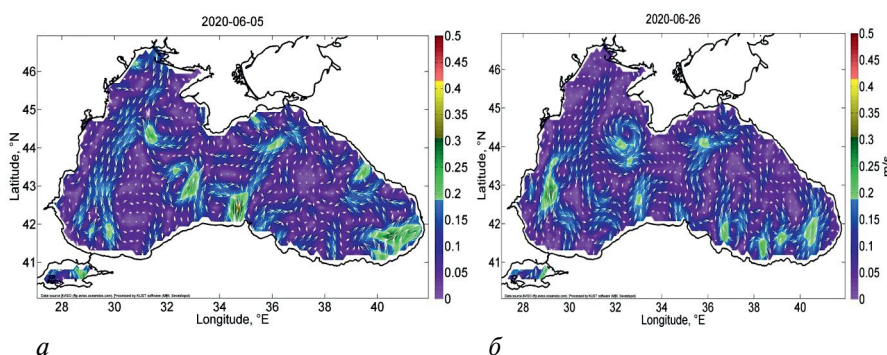


Рис. 2. Расчетные схемы геострофических течений на начало и окончание ихтиопланктонных исследований в июне 2020 г.: а – 05.06.2020; б – 26.06.2020 (Морской портал..., 2021).

глубоководным районам моря, а минимальные – районам непосредственного влияния основных очагов распреснения (прибрежной акватории юго-восточного Крыма (17.4–17.8‰) вследствие поступления азовоморских вод, разгрузки горных рек южнее Новороссийска (17.4–17.8‰) и наиболее прогретым водам дунайского происхождения (16.9–17.4‰) над северным склоном Большой топографической ложбины к западу от Крымского полуострова.

К началу съемки общая система поверхностной циркуляции вод Черного моря определялась неустойчивостью Основного черноморского течения (ОЧТ), образующего в восточной и западной частях моря два ядра основного циклонического круговорота с характерной для июня – июля повышенной интенсивностью последнего (Иванов, Белокопытов, 2011). В прибрежно-шельфовой зоне наблюдались четыре квазистационарных антициклонических круговорота на начальной стадии развития: Кавказский – в юго-восточной части акватории, Керченский – юго-восточнее Таманского полуострова, Крымский – к юго-западу от м. Меганом и Севастопольский – над северным склоном Большой топографической ложбины (рис. 2а).

К концу исследований из выделенных квазистационарных круговоротов дальнейшее развитие получили Севастопольский антициклон, сместившийся к юго-востоку и активизировавшийся над южной частью Большой топографической ложбины, и Крымский антициклон – на шельфе от Феодосийского залива до Ялты. Кавказский антициклон вследствие ослабления ОЧТ трансформировался, расширившись на север и в сторону открытого моря, а Керченский сохранил свое положение и интенсивность (рис. 2б).

Прибрежная акватория Севастополя географически является структурной частью Западного сектора и переходной зоной между акваториями с типичными сезонными гидрологическими режимами – прибрежных вод Южного берега Крыма и западного Крыма (Белокопытов, 2019). В период съемки гидрологический режим в прибрежной акватории Севастополя определялся особенностями прогрева и циркуляции вод северо-западной части моря (рис. 1б, 2б).

Ихтиопланктон. В период исследований были идентифицированы 35 видов икры и личинок рыб (4 вида умеренноводных и 31 вид тепловодных

рыб) из 21 семейства. В открытых водах отмечены 26 видов икры и личинок рыб из 18 семейств, в прибрежной акватории Севастополя — 25 видов из 17 семейств, в Азовском море — 3 вида из 3 семейств (табл. 1).

Средняя численность икры в открытых водах Черного моря колебалась от 7.8 экз/м² в начале июня до 79.5 экз/м² в конце июня, а личинок — от 0.7 до 7.5 экз/м². В прибрежных водах юго-западного Крыма средняя численность икры в июне составляла 161.5, личинок — 25.1 экз/м². В Азовском море средняя численность составляла 462.6 экз/м², а личинок не превышала 7.4 экз/м². Пространственное распределение ихтиопланктона представлено на рис. 3.

В Центральном секторе исследований нерестовый сезон тепловодных рыб только начинался, и на 7 станциях ихтиопланктон отсутствовал. В пробах идентифицированы 9 видов икры и личинок рыб. Средняя численность икры составляла 7.8 экз/м². Икра была представлена в основном тепловодными *Engraulis encrasicolus*, *Trachurus mediterraneus*, *Diplodus annularis*, *Mullus barbatus* и весенне-нерестующей *Scophthalmus maeoticus*. Доминировала икра *E. encrasicolus*, составляя 78.1%. Продолжался нерест умеренноводных *Sprattus sprattus* и *Merlangius merlangus*, доля их икры была достаточно высока, в сумме составляя 19.1%. Личинки были представлены только единичными экземплярами тепловодных *E. encrasicolus*, *Syngnathus schmidtii* и *Gobius niger*, их средняя численность не превышала 0.7 экз/м² (рис. 3, табл. 1).

В Азовском море в ихтиопланктоне были идентифицированы только 3 вида рыб. Доминировали икра и личинки *E. encrasicolus*, средняя численность ее икры составляла 462.6, личинок — 7.4 экз/м², а максимальная численность достигала 1242 и 30 экз/м² соответственно (рис. 3). Личинки *S. schmidtii* и икра *Callionymus* sp. отмечались единично. Икра из семейства *Callionymidae* ранее в Азовском море не встречалась. В Черном море *Callionymidae* нерестится при значительном колебании солености (9.5–18.5‰) от Одесского залива до Керченской предпроливной зоны (Дехник, 1973). Вероятно, в Азовское море икра *Callionymidae* была занесена с черноморскими водами через Керченский пролив при усилении ветров южных румбов. Нельзя исключать и увеличение в последние годы солености в Азовском море (Бердников и др., 2019), что могло послужить благоприятным фактором для расширения районов обитания этого вида.

В Кавказском секторе на 7 станциях икра и личинки рыб отсутствовали. В пробах были отмечены 7 видов только тепловодных рыб (5 видов икры и 2 вида личинок). Средняя численность икры составляла 11.5, а личинок — 0.7 экз/м². Доминировала

икра *E. encrasicolus* (68.7%), единичными экземплярами была отмечена икра *M. barbatus*, *Pomatomus saltatrix*, *T. mediterraneus* и *Callionymus* sp., однако их нерест был безрезультативен. Высокая численность икры (116 экз/м²) наблюдалась только на мелководной станции в районе Анапы (рис. 3). Ихтиопланктон здесь собирали 19 июня после исследований в Азовском море. Около 65% общей численности икры в пробе составляла *E. encrasicolus*, интенсивный нерест которой в это время наблюдался в Азовском море. Известно, что большая часть азовской популяции *E. encrasicolus* зимует южнее Новороссийска и при благоприятных температурных условиях нерестится и в Черном море в зоне влияния азовоморских вод вблизи Керченского пролива (Васильева, 2007). Личинки были представлены двумя видами: *S. schmidtii* и *Symphodus ocellatus* (табл. 1).

В Западном секторе на заключительном этапе исследований в третьей декаде июня икра и личинки отсутствовали только на одной станции. В пробах были идентифицированы 26 видов рыб (13 видов икры и 18 видов личинок) из 18 семейств. Средняя численность ихтиопланктона по сравнению с началом ихтиопланктонной съемки (центральный сектор) возросла на порядок. Численность икры составляла 79.6, а личинок — 7.5 экз/м² (табл. 1). Доминировала икра *E. encrasicolus*, составляя 72.9%, субдоминантным видом была *T. mediterraneus* — 16.5%. Икра остальных видов тепловодных рыб встречалась единично. Среди личинок доминирование было слабо выражено. В пробах преобладали личинки рыб, обычные для прибрежных вод, с длительным периодом постэмбрионального развития. На личинок рыб с демерсальной икрой приходилось 45.3%, а на личинок пелагофильных рыб — 13.3%. Личинки, типичные для открытых вод шельфа, были представлены только *E. encrasicolus* (25.4%) и *S. schmidtii* (12%). Под слоем термоклина продолжался нерест умеренноводных рыб. Доля икры *S. sprattus* и *M. merlangus* в сумме не превышала 2.5%, а личинок трех видов рыб из сем. *Gadidae* — 3.9% (табл. 1).

В прибрежной акватории Севастополя ихтиопланктон присутствовал во всех пробах. Всего были идентифицированы 25 видов икры и личинок рыб из 17 семейств (табл. 1). Средняя численность икры составила 161.5, а личинок — 25.1 экз/м². Если в начале июня при температуре менее 20°C было отмечено 9 видов икры и личинок рыб, а средняя численность икры составляла 73.6 и 5.6 экз/м² соответственно, то в третьей декаде июня при температуре, превышающей 24°C, средняя численность икры достигала 210, а личинок — 36 экз/м². В пробах преобладала икра *D. annularis* (49.7%), а доля икры *E. encrasicolus* составляла около 16%. (табл. 1). В отличие от других районов исследований здесь были широко представлены личинки из сем.

Таблица 1. Видовой состав ихтиопланктона в июне 2020 г. в различных районах исследований

Семейство	Виды	Сектора в Черном море				Азовское море
		Центральный	Кавказский	Западный	Прибрежье Севастополя	
Умеренноводные виды						
Clupeidae	<i>Sprattus sprattus</i> (Linnaeus, 178)	+		+		
Gadidae	<i>Merlangius merlangus</i> Linnaeus, 1758	+		+	+	
	<i>Trisopterus luscus</i> Linnaeus, 1758			+		
	Gadidae spp.			+		
Тепловодные виды						
Engraulidae	<i>Engraulis encrasicolus</i> Linnaeus, 1758	+	+	+	+	+
Syngnathidae	<i>Syngnathus schmidtii</i> Popov, 1927	+	+	+		+
Scorpaenidae	<i>Scorpaena porcus</i> Linnaeus, 1758			+	+	
Serranidae	<i>Serranus scriba</i> (Linnaeus, 1758)			+	+	
Trachinidae	<i>Trachinus draco</i> Linnaeus, 1758				+	
Gobiesocidae	<i>Lepadogaster candolii</i> Risso, 1810			+		
	<i>Diplecogaster bimaculata</i> (Bonnaterre, 1788)			+	+	
	Blenniidae	<i>Parablennius tentacularis</i> (Brünnich, 1768)			+	
	<i>Parablennius sanguinolentus</i> (Pallas, 1814)				+	
	<i>Coryphoblennius galerita</i> (Linnaeus, 1758)				+	
	Blenniidae spp.			+		
Callionymidae	Callionymus sp.		+	+	+	+
Gobiidae	<i>Gobius niger</i> Linnaeus, 1758	+		+	+	
	<i>Pomatoschistus marmoratus</i> (Risso, 1810)			+	+	
	<i>Pomatoschistus minutus</i> (Pallas, 1770)			+	+	
	<i>Pomatoschistus pictus</i> Malm, 1865			+	+	
	<i>Knipowitschia longecaudata</i> (Kessler, 1877)			+		
Carangidae	<i>Trachurus mediterraneus</i> (Staindachner,1868)	+	+	+	+	
Mullidae	<i>Mullus barbatus</i> Linnaeus, 1758	+	+	+	+	
Sciaenidae	<i>Sciaena umbra</i> (Linnaeus, 1758)			+	+	
Sparidae	<i>Diplodus annularis</i> (Linnaeus, 1758)	+		+	+	
	Sparidae spp.				+	
Labridae	<i>Ctenolabrus rupestris</i> (Linnaeus, 1758)				+	
	<i>Symphodus ocellatus</i> (Linnaeus, 1758)		+	+	+	
	<i>Symphodus roissali</i> (Risso, 1810)				+	
	<i>Symphodus cinereus</i> (Bonnaterre, 1788)				+	
Scombridae	<i>Sarda sarda</i> (Bloch, 1793)				+	
Pomatomidae	<i>Pomatomus saltatrix</i> (Linnaeus, 1766)		+	+	+	
Scophthalmidae	<i>Scophthalmus maeoticus</i> (Pallas, 1814)	+		+		
Bothidae	<i>Arnoglossus kessler</i> (Schmidt, 1915)				+	
Soleidae	<i>Pegusa nasuta</i> (Pallas, 1814)			+		

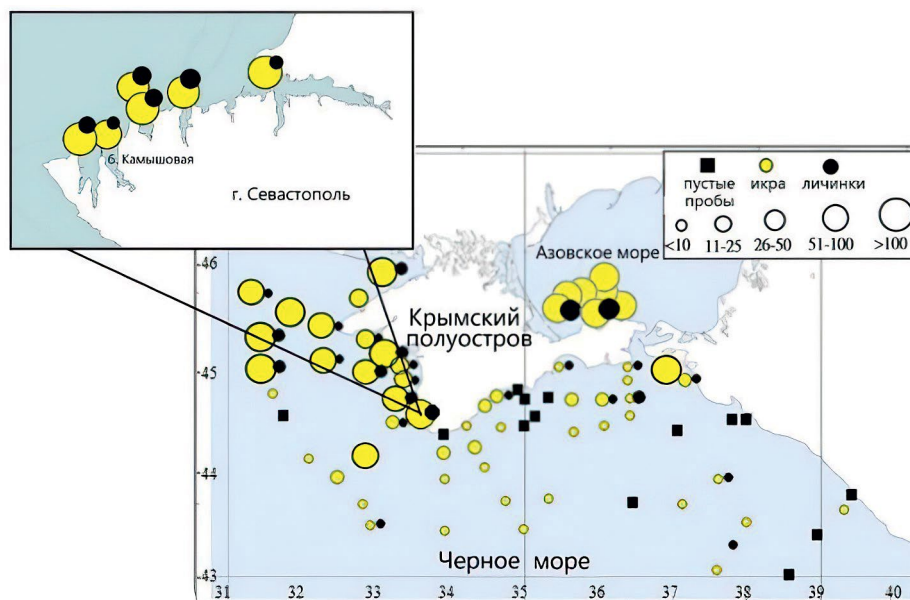


Рис. 3. Карта-схема пространственного распределения ихтиопланктона (экз/м²).

Labridae, из редких видов можно отметить личинку *Coryphoblennius galerita* (Linnaeus, 1758). Нерест массовой промысловой *T. mediterraneus* здесь был результативным, личинки присутствовали практически во всех пробах. Суммарная численность личинок *T. mediterraneus* и *E. encrasicolus* составляла более половины общей численности личинок всех видов, обнаруженных в этом районе. Умеренноводные виды были представлены только единичной икрой *M. merlangus*.

Питание личинок рыб. Выживание личинок рыб в значительной степени зависит от трофических взаимоотношений в планктонном сообществе, а именно — кормовой базы личинок рыб. Изучено питание и размерно-массовые характеристики 60 экз. личинок рыб, относящихся к 7 семействам из Черного моря и 25 экз. личинок *E. encrasicolus* из Азовского моря, в прибрежной акватории Севастополя исследовано 61 экз. личинок рыб из 5 семейств. В Азовском море и в прибрежной акватории Севастополя все личинки *E. encrasicolus* находились на желточном типе питания. Наиболее благоприятные условия для выживания личинок наблюдались в западном секторе исследований, где пробы отбирались в третьей декаде июня. Здесь был отмечен наиболее широкий размерный ряд личинок *E. encrasicolus* (TL от 2.3 до 6.6 мм), которые находились на желточном, смешанном и внешнем типах питания. В кишечниках личинок *E. encrasicolus* на внешнем типе питания (длина более 6 мм) пищевые организмы были переварены до аморфной массы. В пищевом комке личинок остальных видов идентифицированы ювенильные стадии копепод. Кладоцеры отмечены у *S. schmidtii*,

K. longicaudata и *Lepadogaster candolii*, единично встречались яйца гидробионтов. Большое количество пищевых объектов в кишечниках личинок, пойманных в западном секторе, свидетельствует о благоприятных кормовых условиях в исследуемый период. Так, если в западном секторе исследований в кишечниках *S. schmidtii* обнаружено от 5 до 28 пищевых объектов, то в центральном секторе исследований их количество колебалось от 1 до 6, в районе Кавказа — от 1 до 4 экз., а у экземпляра, пойманного в Азовском море, отмечено только 2 объекта (Copepoda (Calanoida)) длиной 0.25 мм. У личинок сем. Gobiidae пищевые организмы (от 1 до 3 экз. на один кишечник) встречались только в западном секторе исследований.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные о видовом составе и численности ихтиопланктона в разных районах, соответствующих конкретным этапам формирования летнего типа термической стратификации вод, свидетельствуют о существенных региональных отличиях ихтиопланктонных комплексов. В течение июня 2020 г. в открытых водах Черного моря наблюдалось последовательное развитие летнего нерестового сезона тепловодных видов рыб.

В центральном секторе исследования выполняли на заключительной фазе весеннего гидрологического сезона при интенсивном прогреве верхнего слоя моря, однако ВКС летнего типа еще не сформировался. В начале съемки на большей части акватории температура поверхности моря составляла 16–17°C. Пониженные значения температуры воды

(до 14°C) наблюдались в узкой прибрежной зоне от Ялты до Феодосийского залива как остаточное проявление прибрежного апвеллинга, а наиболее высокие (до 17.5–18.0°C) — в водах ОЧТ в южной части сектора (рис. 1а). Активный прогрев верхнего слоя моря продолжался до начала второй декады месяца, когда ТПМ увеличилась до 21–22°C. В период с 4 по 15 июня в центральном секторе исследований в ихтиопланктоне было отмечено 9 видов (7 тепловодных), а средняя численность икры и личинок составляла всего 7.8 и 0.7 экз/м². Сложившаяся термическая структура верхнего слоя моря не способствовала нересту тепловодных видов рыб, что подтверждается высокой долей (19%) икры умеренноводных *S. sprattus* и *M. merlangus* в пробах.

Начиная с середины второй декады июня активизация атмосферных процессов над бассейном Черного и Азовского морей привела к усилению ветро-волнового перемешивания и замедлению прогрева верхнего слоя моря. Волнение моря до 3 баллов по всей акватории кавказского сектора отмечалось с 19 по 21 июня. Вследствие вовлечения в верхний слой моря холодных вод из слоя максимальных вертикальных градиентов температуры значения ТПМ по сравнению с предшествующими понизились на 1–2°C, что замедлило процесс формирования летнего типа вертикальной термической стратификации (Филлипс, 1980). Таким образом, съемка в кавказском секторе выполнялась в начальной фазе летнего гидрологического сезона со слабо выраженным ВКС толщиной до 5–7 м и перепадом температур от 22–24°C на поверхности до 18–20°C на глубине 20 м. Усиление ветро-волнового перемешивания и замедление прогрева верхнего слоя моря не способствовали нерестовой активности теплолюбивых видов рыб. В ихтиопланктонных пробах были отмечены всего 7 видов, средняя численность икры составляла 11.5, а личинок — 0.7 экз/м². Активный нерест *E. encrasicolus* наблюдался только в пределах Керченского антициклона в северо-восточной части акватории в сложившихся благоприятных термодинамических условиях при минимальной ветро-волновой активности. Здесь численность ее икры составляла 116 экз/м², однако личинки в пробах отсутствовали.

В Западном секторе исследований съемка выполнялась уже в летний гидрологический сезон при значениях температуры поверхности моря 23–26°C (рис. 1б). Сформировавшаяся термическая структура летнего типа с ВКС толщиной более 10 м способствовала началу массового нереста тепловодных видов рыб. Здесь были отмечены 26 видов икры и личинок рыб. Средняя численность как икры, так и личинок возросла по сравнению с центральным сектором исследований на порядок и составляла 79.5 и 7.5 экз/м² соответственно. В прибрежной акватории средняя численность

ихтиопланктона превышала значения открытых вод в 2 раза по икре и в 3.5 раза по личинкам, а их максимальная численность достигала 368 и 85 экз/м² соответственно. Одновременно было отмечено массовое развитие кормового зоопланктона как в прибрежной акватории, так и в открытых водах северо-западной части Черного моря, что подтверждается высокой численностью личинок, находящихся на разных типах питания, и большим количеством кормовых организмов в их кишечниках.

В последние годы в летний гидрологический сезон было отмечено увеличение количества узкоприбрежных видов ихтиопланктона в открытых водах шельфа в связи с усилением роли прибрежно-шельфовых квазистационарных антициклонических вихрей вдоль берегов Крыма и Кавказа при снижении интенсивности ОЧТ (Белокопытов, 2017; Климова и др., 2021). В третьей декаде июня большая часть акватории западного сектора находилась под влиянием квазистационарного антициклонического круговорота (Севастопольский антициклон). Циркуляция вод в системе Севастопольского антициклона способствовала выносу по своей восточной периферии зоо- и ихтиопланктона с прибрежной акватории западного Крыма в открытые воды (рис. 2б). Одновременно по северо-западной периферии антициклона отмечено поступление хорошо прогретых дунайских вод с пониженной соленостью, которые также способствовали выносу планктона из прибрежных акваторий северо-западного шельфа в открытые воды (рис. 1б). Увеличение количества видов в открытых водах западного сектора наблюдалось в основном за счет личинок узкоприбрежных рыб с демерсальной икрой из семейств *Gobiesocidae*, *Blenniidae*, *Gobiidae*, *Labridae*.

Поскольку количество видов в ихтиопланктоне прибрежной акватории Севастополя и открытых вод западного сектора оказалось одного порядка, мы проанализировали состояние ихтиопланктонных комплексов этих районов с помощью наиболее часто употребляемых индексов видового разнообразия (индексов видового разнообразия, видового богатства, доминирования и выровненности), предложенных (Одум, 1986), а также индексов видового (Sørensen, 1948) и структурного сходства (Константинов, 1969).

Высокое видовое разнообразие обычно характеризуется максимальной выровненностью и отсутствием доминирования отдельных видов (Одум, 1986). В прибрежной акватории Севастополя была отмечена высокая выровненность (0.53) и низкое доминирование (0.27) отдельных видов, что привело к повышению индекса видового разнообразия ихтиопланктона до 2.44 (табл. 2). Показатели индексов видового богатства зависят от количества видов в изучаемом сообществе и суммарной

Таблица 2. Показатели индексов видового разнообразия ихтиопланктона

Индексы разнообразия	Западный сектор	Прибрежная акватория Севастополя
Индекс видового разнообразия (Shannon, 1949)	1.77	2.45
Индекс видового богатства (Simpson, 1949)	13.04	10.63
Индекс доминирования (Margalef, 1958)	0.52	0.27
Индекс выровненности (Pielou, 1966)	0.38	0.53
Количество видов	26	25

численности всех особей. Поэтому, несмотря на сопоставимое число видов, индекс видового богатства в открытых водах оказался выше, чем в прибрежной акватории Севастополя, где численность была намного выше (табл. 2).

Сопоставимое количество видов в ихтиопланктоне обоих районов исследований способствовало повышению показателя индекса видового сходства (Sørensen, 1948) ихтиопланктона, который составил (0.63). Индекс структурного сходства (Константинов, 1969) в данных районах для икры составил всего 36.6, а для личинок — 46.7, что вполне закономерно в связи с различиями в структуре видового состава икры и личинок в открытых и прибрежных водах. Структура видового состава икры была типичной (Дехник, Павловская, 1979) как в открытых водах Западного сектора с доминированием *E. encrasicolus*, так и в прибрежной акватории моря, где доминирование не было выражено, а в пробах преобладала икра *D. annularis*, *E. encrasicolus*, *T. mediterraneus* и *M. barbatus*. Однако среди личинок отсутствие доминирования наблюдалось в обоих районах исследований, а высокая доля личинок узкоприбрежных видов способствовала увеличению показателя индекса структурного сходства.

В первой половине июня наблюдался период активного прогрева верхнего слоя моря. Значения ТПМ колебались от 19 до 22°C и были благоприятны для нереста и эмбрионального развития икры наиболее массового тепловодного вида черноморской ихтиофауны — *E. encrasicolus*. В Центральном секторе исследований средняя численность икры еще не превышала 6.0 экз/м², однако нерест был результативным, доля личинок от количества икры в ловах составляла 2.1%.

В конце второй декады июня в Азовском море несмотря на то, что средняя численность икры *E. encrasicolus* превышала 460 экз/м², процент личинок от количества икры в пробах был низким (1.6%), причем все личинки находились на желточном типе питания. Низкая эффективность нереста *E. encrasicolus* в Азовском море, вероятно, связана с климатическим осолонением азовских вод (Бердников и др., 2019). Уже с 2017 г. соленость достигла 14–15‰, что приводило к смене солоноватоводных

видов зоопланктона на морские. Для выживания личинок рыб в период перехода на внешний тип питания необходимо достаточное количество мелкоразмерных фракций кормового зоопланктона. Однако массовое развитие морского зоопланктона, в отличие от солоноватоводного, наблюдается при более высокой температуре воды в море (Надолинский, Надолинский, 2018). Температура воды в период исследований не превышала 22°C. Вероятно, именно низкая численность мелкоразмерных фракций в кормовом зоопланктоне Азовского моря отрицательно повлияла на выживание личинок *E. encrasicolus*. Данное предположение подтверждается нашими данными по размерному составу и питанию личинок рыб Азовского моря.

В западном секторе съемка выполнялась уже в начальной фазе летнего гидрологического сезона при значениях ТПМ свыше 23°C и сформировавшемся ВКС летнего типа толщиной более 10 м, что было благоприятным как для нереста теплолюбивых рыб, так и массового развития кормового зоопланктона. Эффективность нереста *E. encrasicolus* в открытых водах западного сектора была сопоставима с таковой в прибрежной акватории Севастополя в конце 1958–1959 гг., когда в июне на траверзе Камышовой бухты при температуре поверхности моря 18–19°C она составляла 3.2% (Дехник, 1973). В прибрежной акватории Севастополя в том же районе исследований в конце третьей декады июня 2020 г. температура поверхности в море уже достигала 26°C, а эффективность нереста составила 34%, что соответствовало эффективности в разгар нереста *E. encrasicolus* в июле — августе 1950-х гг.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Последовательность выполнения ихтиопланктонных исследований в процессе формирования термической структуры вод, благоприятной для начала массового нереста теплолюбивых рыб, показала резкое увеличение количества видов и численности ихтиопланктона от заключительной фазы весеннего гидрологического сезона до начальной фазы летнего. Если в начале исследований при

активном прогреве поверхности моря и отсутствии ВКС в центральном секторе исследований в ихтиопланктоне были отмечены 9 видов, средняя численность икры составляла 7.8, а личинок 0.7 экз/м², то к концу ихтиопланктонной съемки в западном секторе в условиях сформировавшейся термической структуры летнего типа с толщиной ВКС более 10 м количество видов возросло до 26, их численность возросла на порядок. Здесь же наблюдались наиболее благоприятные условия для выживания личинок рыб, что подтверждено широким размерным рядом личинок и большим количеством пищевых объектов в их кишечниках.

Наиболее благоприятные условия для выживания ихтиопланктона наблюдались в прибрежной акватории Севастополя, где отмечены максимальная численность икры и личинок рыб и высокие показатели индексов видового разнообразия. К концу третьей декады июня эффективность нереста массового промыслового вида *E. encrasicolus* была сопоставима с июлем — августом середины XX века и составляла свыше 34%.

В конце второй декады июня, несмотря на благоприятную температуру поверхности моря (22–24°C), активизация циклонической деятельности в восточной части моря привела к замедлению процесса образования термической стратификации летнего типа в Кавказском секторе исследований. Количество видов и численность ихтиопланктона были сопоставимы с таковым в Центральном секторе в период заключительной фазы весеннего гидрологического сезона.

Низкая эффективность нереста *E. encrasicolus* в Азовском море, вероятно, связана с климатическим осолонением азовских вод, что привело к смене солоноватоводных видов зоопланктона на морские, чье массовое развитие наблюдается в более поздние сроки, не совпавшие с интенсивным нерестом азовоморской популяции *E. encrasicolus*, который наблюдался в период наших исследований.

Сравнительный анализ структуры видового состава икры прибрежных и открытых вод западного сектора показал их соответствие с периодом устойчивого состояния ихтиопланктона в середине прошлого века (выраженное доминирование одного вида в открытых водах и отсутствие доминирования в прибрежных водах), что подтверждается низким показателем индекса структурного сходства (36.6).

Развитие квазистационарного Севастопольского антициклона, наряду с особенностями циркуляции вод северо-западной части Черного моря, определяли динамику вод в западном секторе исследований, способствующую выносу личинок прибрежных видов с длительным периодом постэмбрионального развития в сторону открытого

моря. В результате количество видов в ихтиопланктоне и структура видового состава личинок рыб (отсутствие выраженного доминирования) в открытых водах западного шельфа оказалась близкой к таковой в прибрежной акватории моря, а индекс структурного сходства личинок составил 46.7.

Работа выполнена по темам госзадания № 121030100028-0 “Закономерности формирования и антропогенная трансформация биоразнообразия и биоресурсов Азово-Черноморского бассейна и других районов Мирового океана” и № 121030300149-0 “Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белокопытов В.Н. Климатические изменения гидрологического режима Черного моря. Автореф. дис. д-ра геогр. наук. Севастополь: МГИ, 2017. 42 с.
- Белокопытов В.Н. Сезонный ход вертикальной термохалинной стратификации вод на Черноморском шельфе Крыма // Экол. безоп. прибрежной и шельфовой зон моря. 2019. Вып. 3. С. 19–24.
- Бердников С.В., Дашкевич Л.В., Кулыгин В.В. Климатические условия и гидрологический режим Азовского моря в XX — начале XXI вв. // Водные биоресурсы и среда обитания. 2019. Т. 2. № 2. С. 7–19.
- Васильева Е.Д. Рыбы Черного моря. Определитель морских, солоноватоводных, эвригалинных и проходных видов с цветными иллюстрациями, собранными С.В. Богородским. М.: ВНИРО, 2007. 238 с.
- Гершанович Д.Е., Муромцев А.М. Океанологические основы биологической продуктивности Мирового океана. Л.: Гидрометеиздат, 1982. 320 с.
- Дехник Т.В. Ихтиопланктон Черного моря. Киев: Наук. думка, 1973. 234 с.
- Дехник Т.В., Павловская Р.М. Сезонные изменения видового состава, распределение и численность ихтиопланктона // Основы биологической продуктивности Черного моря / Под ред. В.Н. Грезе. Киев: Наукова думка, 1979. С. 268–272.
- Дука Л.А., Синюкова В.И. Руководство по изучению питания личинок и мальков морских рыб в естественных и экспериментальных условиях. Киев: Наукова думка, 1976. 133 с.
- Иванов В.А., Белокопытов В.Н. Океанография Черного моря. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2011. 212 с.

- Климова Т.Н., Субботин А.А., Мельников В.В., Серебренников А.Н., Подрезова П.С. Пространственное распределение ихтиопланктона у Крымского полуострова в летний сезон 2013 г. // Морской биологический журнал. 2019. Т. 4. № 1. С. 63–80.
- Климова Т.Н., Вдодович И.В., Субботин А.А., Загородняя Ю.А., Подрезова П.С., Гарбазей О.А. Распределение ихтиопланктона в связи с особенностями гидрологического режима у берегов Крыма (Черное море) в весенне-летний сезон 2017 г. // Вопросы ихтиологии. 2021. Т. 61. № 2. С. 194–204.
- Константинов А.С. Использование теории множеств в биогеографическом и экологическом анализе // Успехи современной биологии. 1969. Т. 67. Вып. 1. С. 99–108.
- Маркова Н.В., Белокопытов В.Н., Дымова О.А., Миклашевская Н.А. Оценка климатических полей температуры и солености вод Черного моря для современного периода (1991–2020) // Морской гидрофизический журнал. 2021. Т. 37. № 4. С. 423–435.
- Морозов А.Н., Маньковская Е.В. Холодный промежуточный слой Черного моря по данным экспедиционных исследований 2016–2019 годов // Экол. безоп. прибрежной и шельфовой зон моря 2020. № 2. С. 5–16.
- Морской портал. Архив данных по Черному морю. [Электронный ресурс]. http://dvs.net.ru/mp/data/main_ru.shtml/ (дата обращения 23.04.2021).
- Надолинский В.П., Надолинский Р.В. Изменения в видовом составе и численности ихтиопланктона Азовского и северо-восточной части Черного морей за период 2006–2017 гг. под воздействием природных и антропогенных факторов // Водные биоресурсы и среда обитания. 2018. Т. 1. № 1. С. 51–66.
- Одум Ю. Экология. М.: Мир, 1986. Т. 2. 373 с.
- Определитель фауны Черного и Азовского морей // Свободноживущие беспозвоночные: В 3 т. Ракообразные. Киев: Наукова думка, 1969. Т. 2. 536 с.
- Павловская Р.М. Основные причины колебаний урожайности поколений черноморской хамсы // НТИ (ВНИРО). 1963. Вып. 9. С. 23–35.
- Подымов О.И., Зацепин А.Г., Очеретник В.В. Рост солености и температуры в деятельном слое северо-восточной части Черного моря с 2010 по 2020 г. // Морской гидрофизический журнал. 2021. Т. 37. № 3. С. 279–287.
- Троценко О.А., Субботин А.А. Абиотические факторы и условия обитания гидробионтов прибрежной зоны Юго-Восточного Крыма. Гидрологические особенности // Биология Черного моря у берегов Юго-Восточного Крыма. Симферополь: ИТ “АРИАЛ”, 2018. С. 46–59.
- Троценко О.А., Субботин А.А., Еремин И.Ю. Изменчивость основных лимитирующих факторов среды в процессе выращивания двустворчатых моллюсков на ферме в районе Севастополя // Уч. зап. КФУ. Сер. география и геология. 2019. Т. 5. № 2. С. 308–321.
- Филлипс О.М. Динамика верхнего слоя океана. Л.: Гидрометеиздат, 1980. 319 с.
- Auth T.D., Daly E.A., Brodeur R.D., Fisher J.L. Phenological and distributional shifts in ichthyoplankton associated with recent warming in the northeast Pacific Ocean // Global Change Biol. 2017. V. 24. № 1. P. 259–272.
- Cushing D.H. The regularity of the spawning season of some fishes // ICES Journal of Marine Science. 1969. V. 33 (1). P. 81–92.
- Houde E.D. Fish early life dynamics and recruitment variability // American Fisheries Society Symposium. 1987. V. 2. P. 17–29.
- Klimova T., Vdodovich I., Podrezova P. Ichthyoplankton of the shelf and deepwater areas of the north and northeast of the Black Sea in the spring season // Turk. J. Fish. & Aquat. Sci. 2021. V. 5. P. 255–263.
- Klimova T.N., Podrezova P.S. Seasonal distribution of the Black Sea ichthyoplankton near the Crimean Peninsula // Regional studies in Marine Science. 2018. V. 24. P. 260–269.
- Kubryakov A.A., Stanichny S.V., Zatsepin A.G., Kremenetskiy V.V. Long-term variations of the Black Sea dynamics and their impact on the marine ecosystem // Journal of Marine Systems. 2016. V. 163. P. 80–94.
- Leggett W.C., DeBlois E. Recruitment in marine fishes: Is it regulated by starvation and predation in the egg and larval stages? // Netherlands Journal of Sea Research. 1994. V. 32 (2). P. 119–134.
- Oguz T. Controls of Multiple Stressors on the Black Sea Fishery. Frontiers in Marine Science. 2017. V. 4. P. 1–12.
- Ohlberger J., Thackeray S.J., Winfield I.J., Maberly S.C., Vollestad L.A. When phenology matters: Age-size truncation alters population response to trophic mismatch // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2014. V. 281. 20140938. P. 1–7.
- Russell F.S. The eggs and planktonic stages of British marine fishes. London, New York, San Francisco: Acad. Press, 1976. 524 p.
- Sörensen T. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content // Kongelige Danske Videnskabernes Selskab. Biol. Skrifter. Bd V. 1948. № 4. P. 1–34.
- Turan C., Gürlek M. Climate Change and Biodiversity Effects in Turkish Seas // Natural and Engineering Sciences. 2016. V. 1. № 2. P. 15–24.
- WoRMS Editorial Board. 2021. World register of marine species. (<https://www.marinespecies.org/index.php>. Version 02/2022). <https://doi.org/10.14284/170>.

Regional variability of the Black Sea ichthyoplankton state during the change of the spring hydrological season to the summer

P. S. Podrezova¹, N. N. Klimova¹, A. A. Subbotin¹, I. V. Vdodovich^{1, #}, A. V. Zavjyalov¹

¹Federal State Budgetary Institution of Science Federal Research Center "Institute of Biology of the Southern Seas named after A. O. Kovalevsky RAS", ave. Nakhimova, 2, Sevastopol, 299011 Russia

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

The species diversity and spatial distribution of ichthyoplankton in the coastal and open waters of the northern part of the Black Sea and the southwestern part of the Sea of Azov in June 2020 are presented. The species diversity and abundance of ichthyoplankton changed in accordance with the regional conditions of warming of the sea upper layer during the formation of a vertical thermal structure of the summer type. The most favorable conditions for the survival of ichthyoplankton were observed in the open and coastal waters of the Western Sector of research in the initial phase of the summer hydrological season.

Keywords: ichthyoplankton, species diversity, spatial distribution, feeding of fish larvae, Black Sea, hydrological regime

ЭМИССИЯ ОКСИДОВ АЗОТА В ПОЧВАХ БОРЕАЛЬНЫХ ЛЕСОВ (ОБЗОР)

С. М. Разгулин*, @

Институт лесоведения РАН, ул. Советская д. 21, с. Успенское, Одинцовский р-н, Московская обл. 143030 Россия

@E-mail: kriador@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.03.2023 г.

После доработки 22.07.2023 г.

Принята к публикации 01.08.2023 г.

Обсуждаются денитрификационные потери азотсодержащих газов в биоме бореальных лесов. В почвах хвойных и лиственных лесов Западной Европы при денитрификации теряется 0.57 ± 0.2 и 1.0 ± 0.2 кг N-N₂O/га/год. В Северной Америке этот показатель был равен 0.35 ± 0.29 кг N-N₂O/га/год для всех насаждений. Эмиссия N₂O из лесных почв была связана с поступлением азота с атмосферными осадками с $r = 0.47$ в хвойных лесах и с $r = 0.68$ в лиственных насаждениях. Из почв в атмосферу возвращалось до 30% азота атмосферных выпадений. При большой атмосферной нагрузке эмиссия N₂O составляла 20 кг N/га/год. На долю NO, N₂O и N₂ приходилось 21, 15 и 64%. Измерения эмиссии NO и особенно N₂ остаются весьма редкими, что приводит к неполным оценкам денитрификационных потерь. Денитрификация является одним из самых трудных для исследования процессов азотного цикла в связи с отсутствием оптимального метода измерения.

Ключевые слова: нитрификация, денитрификация, азот атмосферных осадков, эмиссия азотсодержащих газов, лесные почвы

DOI: 10.31857/S1026347024010127, **EDN:** LMMZYI

Леса занимают около 40 млн км² (27% площади суши) и являются самыми распространенными экосистемами нашей планеты, в значительной степени обеспечивающими функционирование биосферы. На биом бореальных лесов приходится около половины этой площади (Реймерс, 1990).

Реализация основных биогеохимических циклов (C и N) в лесу происходит в сложноустроенных экосистемах с почвенным профилем, пронизанным корневыми окончаниями с ризосферными зонами, микоризными комплексами, сапротрофными грибами, бактериями и почвенной фауной. Трансформация органического вещества почвы происходит с участием циклического поступления корневых экссудатов, составляющих до 40% углерода нетто-фотосинтеза деревьев (Llado *et al.*, 2017).

В цикле азота в лесу значительный интерес представляют процессы денитрификации, ветви азотного цикла, продуцирующей оксиды азота и молекулярный азот в лесных почвах. Это важная часть расходного баланса азота в лесу, до настоящего времени определяемая весьма приближенно. Часть продуктов денитрификации поступает в атмосферу, увеличивая парниковый эффект.

В отечественной литературе есть обобщающие публикации по потерям закиси азота в пахотных почвах (Кудеяров, 2020), но аналогичные работы для лесных почв отсутствуют. Настоящая публикация содержит обзор и анализ зарубежной информации по измерению продуктивности процесса денитрификации в почвах бореальных лесов. Отечественные публикации на эту тему остаются крайне редкими (Гришакина, 2007; Комарова и др., 2015; Климова и др., 2019).

Микробиологические процессы образования газообразного азота и оксидов азота в лесных почвах. К ним относится нитрификация, денитрификация, хемоденитрификация, диссимиляторная нитратредукция. В биосфере основная роль в продуцировании оксидов азота принадлежит гетеротрофной денитрификации, где закись азота выделяют бактерии и грибы с NO редуктазами, а потребляют преимущественно бактерии с N₂O редуктазой, которой нет у грибов. NH₄⁺ окисляется до NO₃⁻ и затем восстанавливается до NO₂⁻, NO, N₂O и N₂ (Умаров и др., 2007). Не исключают и участие автотрофной “нитрификационной денитрификации”, осуществляемой автотрофными нитрификаторами (van Groenigen *et al.*, 2015). Выделение вклада указанных процессов в общий эмиссионный поток

азотсодержащих газов сталкивается с серьезными методическими затруднениями (Умаров, и др., 2007; Ананьева и др., 2015). Вопрос о соотношении вклада грибов и бактерий в процесс денитрификации изучен недостаточно (Xu *et al.*, 2021). Для осуществления процессов денитрификации в почве необходимы носители процесса, нитраты, дефицит кислорода, лабильное органическое вещество и соответствующие температура и увлажнение. Полагают, что денитрифицирующие бактерии составляют 10–15% бактериальной популяции в почве, воде и отложениях (Ambus, Zechmeister-Boltenstern, 2007). Кроме того, в лесу оксиды азота способны выделяться из крон хвойных деревьев при фотолизе HNO_3 , обеспечивая потери азота, равные 52 г/га за вегетационный период (Raivonen *et al.*, 2006).

Методы измерения денитрификации и особенности реализации процесса в почве. Процесс денитрификации всегда был сложным для исследования из-за проблем измерения крайне низких концентраций оксидов азота и малых изменений содержания N_2 на фоне его высокого присутствия в атмосфере. Существует несколько методологических подходов для измерения процесса: определение в атмосфере ацетилена, использование изотопов ^{14}N и ^{15}N , прямое количественное определение N_2 , определение отношения $\text{N}_2:\text{Ar}$, подходы с балансом массы, стехиометрический подход, использование градиента экологических трассеров денитрификации, молекулярный подход (Groffman *et al.*, 2006a; Butterbach-Bahl *et al.*, 2013). При исследовании почв наиболее часто используют ацетиленовый и изотопный методы. Ацетилен останавливает восстановление NO_3^- на стадии N_2O (Федорова и др., 1973). При этом ацетилен ингибирует одни процессы азотно-углеродного цикла и стимулирует другие (Oremland, Carone, 1988), что искажает результаты измерения N_2O . Поскольку при микробной трансформации азотсодержащих соединений происходит дискриминация содержания ^{15}N в каждом последующем продукте, то используют отношение изотопов $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$ для количественных оценок процесса. Все подходы при своей реализации сталкиваются с серьезными методическими затруднениями и имеют свои достоинства и недостатки. Оптимального метода для измерения денитрификации нет (Groffman *et al.*, 2006a). Это обстоятельство, а также высокий пространственный разброс активности процесса при его реализации в почве (van Groenigen *et al.*, 2015) и наличие суточной динамики (Wu *et al.*, 2021) делают денитрификацию очень сложной для изучения ветвью азотного цикла.

Продуцирование и распределение азотсодержащих газов в почвенном профиле. Эмиссия закиси азота лесными почвами в течение года зависит от продуцирования и ассимиляции N_2O микроорганизмами в почвенном профиле. При доминировании образования газа закись азота выделяется из

почвы, если преобладает потребление, то почва адсорбирует этот газ (Kellman, Kavanaugh, 2008; Matson *et al.*, 2009; Saari *et al.*, 2009).

Повышенные концентрации закиси азота в почвенном профиле отмечены на глубине ниже 30 см с увеличением концентраций N_2O вниз по профилю почвы. Этот градиент формируется с середины января и достигает максимума (более 10 раз) в начале марта. В верхней части профиля газ ассимилируется, а в нижней образуется, в связи с пониженной активностью N_2O редуктаз из-за возможного дефицита воды в период морозов. Через гранулированный проницаемый барьер мерзлой почвы закись азота диффундирует в атмосферу. Снежный покров может сдерживать диффузию. В мае активизируются корни растений, поглощающих минеральный азот. Градиент концентраций N_2O в почвенном профиле исчезает к середине июля (Klemmedson *et al.*, 1997; Kitzler *et al.*, 2006; Goldberg *et al.*, 2010).

В кислых, грубогумусных почвах бореальной зоны с преобладанием аммонификации над нитрификацией образуется мало нитратов, что сдерживает развитие денитрификации.

Выделение продуктов денитрификации из почв бореальных лесов. В Западной Европе выделение закиси азота из почв в хвойных лесах изменяется от 0.025 кг N/га/год в Швеции до 1.5 кг N/га/год в Германии при средней оценке равной 0.57 ± 0.16 кг N/га/год (табл. 1). В лиственных массивах среднее значение этого показателя равно 1.1 ± 0.34 кг N/га/год, при отклонениях от 0.17 до 4.1 кг N/га/год. В расчеты не включен максимум процесса, равный 20 кг N/га/год в дубово-буковом лесу в Нидерландах (табл. 2).

Эмиссия закиси азота на осушенных органических почвах елового леса в Швеции была в 6 раз выше, чем из минеральной почвы, и составляла 2.4 ± 0.2 и 0.4 ± 0.15 кг N/га/год (Aurangjeb *et al.*, 2017).

В Северной Америке с меньшим поступлением азота из атмосферы выделение N_2O в хвойных и лиственных лесах составляет в среднем 0.35 ± 0.29 кг N/га/год, изменяясь от 0.02 кг N/га/год в канадской тайге до 2.1 кг N/га/год в хвойном лесу штата Висконсин, США (табл. 1). От средних значений минерализации азота в подстилке и гумусовых горизонтах средневозрастных хвойных (50 кг N/га/год) и лиственных (100 N/га/год) лесов (Разгулин, 2022) средние газообразные потери элемента не превышают 1%.

Максимальное выделение закиси азота (72 кг N/га 11 месяцев) отмечено при осушении ольхового болота в Германии. После мелиорации эмиссия газа снизилась до 1–5 кг N/га/год (табл. 2).

Межгодовые различия продукции закиси азота в лесных почвах изменялись от 1,5 раз в канадской

Таблица 1. Эмиссия оксидов азота и молекулярного азота из почв хвойных лесов

Лесной фитоценоз	Географическое положение	кг N га ⁻¹ год ⁻¹				Источник
		N _{атм}	N ₂ O	NO		
Сосновый лес	Финляндия	3	0.026	0.0005		Pilegaard <i>et al.</i> , 2006
Сосновый лес	Германия	24	0.52–4.5	0.22–2.7		Butterbach-Bahl <i>et al.</i> , 1997
Сосновый лес	То же	35	0.4–1.3			Borken, Beese, 2005
Сосновый лес, май – ноябрь	Провинция Саскачеван, Канада	3.8	0.05; 0.08			Matson <i>et al.</i> , 2009
Сосновый лес. Возраст, годы	Провинция Онтарио, Канада	4				Peichl <i>et al.</i> , 2010
4			–0.13			
17			0.05			
32			–0.082			
67, апрель – декабрь			–0.28			
Сосновый лес	Северо-восток США	10	0.016			Bowden <i>et al.</i> , 1991
Еловый лес	Швеция	4–5	0.025			Klemmedson <i>et al.</i> , 1997
Еловый лес	Германия	24–40	0.31			Borken <i>et al.</i> , 2002
Еловый лес	То же	24	0.4; 1.3			Borken, Beese, 2005

Лесной фитоценоз	Географическое положение	кг N га ⁻¹ год ⁻¹				Источник
		*N _{атм}	N ₂ O	NO	N ₂	
Еловый лес	Германия	24	1.5			Goldberg <i>et al.</i> , 2010
Еловый лес	То же	25	0.4–3.1	6.4–9	7.2	Butterbach-Bahl <i>et al.</i> , 2002a
Хвойный лес	То же	20	0.17			Schulte-Bisping <i>et al.</i> , 2003
То же	Западная Европа	15	0.52	2.7		Pilegaard <i>et al.</i> , 2006
Лес из дугласии	Нидерланды	35		0.12		van Dijk, Duyzeret, 1999
Еловый лес	Провинция Саскачеван, Канада	4	0.08–0.12			Matson <i>et al.</i> , 2009
Хвойный лес	То же	4	0.02			Corre <i>et al.</i> , 1999
Лес из ели и пихты, март – ноябрь	Полуостров Новая Шотландия, Канада	10	0.10			Kellman, Kavanaugh, 2008
Хвойный лес	Штат Висконсин, США	8	2.1			Goodroad, Keeney, 1984

Примечание. *N_{атм} – поступление азота с атмосферными осадками.

тайге (Matson *et al.*, 2009), до 4 раз в широколиственных лесах США (Bowden *et al.*, 1991; 2000; Groffman *et al.*, 2006б) и достигали 3.5–7 раз в лесах Западной Европы (Butterbach-Bahl *et al.*, 1997, 2002б). В депрессиях рельефа этот показатель возрастал до 6 раз (Groffman *et al.*, 2011).

Сведения о поступлении NO и N₂ из лесных почв в атмосферу очень ограничены. В Западной Европе выделение оксида азота изменялось от 0.0005 кг N/га/год в сосновом лесу в Финляндии до 9 кг N/га/год в насаждении ели в Германии (табл. 1) при среднем значении равном 2.7–3 ± 1.3 кг N/га/год.

Лиственные насаждения характеризуются изменением данного показателя от 0.21 до 3.5 кг N/га/год и составляют в среднем 1.33 ± 0.67 кг N/га/год (табл. 2).

Одновременные измерения эмиссии NO, N₂O и N₂ остаются единичными. В Германии общее выделение этих газов из почвы хвойного и букового леса составило 16.6 и 19.4 кг N/га/год. Оксид азота составлял 46 и 15% общего потока, на закись азота приходилось 10 и 21%. Вклад молекулярного азота был равен 43 и 64% (табл. 1, 2). Малое количество измерений эмиссии NO и N₂ из лесных почв занижает оценку денитрификационных потерь.

В Западной Европе в среднем из почв хвойных и лиственных лесов выделяется 2.7 ± 1.3 и 0.35 ± 0.16 кг N/га/год оксида азота и 0.57 ± 0.2 и 1 ± 0.2 кг N га/год закиси азота. Во всех лесах продукция закиси азота не была связана с азотом атмосферы (Pilegaard *et al.*, 2006). Однако максимум выделения N₂O из лесной почвы был отмечен в Нидерландах (20 кг N/га/год) при рекордной

атмосферной нагрузке 50 кг N /га/год (Tietema *et al.*, 1991).

В хвойных лесах продукция NO хорошо соотносилась с приходом азота из атмосферы ($r^2 = 0.82$) и не была связана с этим показателем в лиственных массивах. Денитрификация обеспечивала возвращение в атмосферу до 30% азота атмосферных осадков (Tietema *et al.*, 1991; Pilegaard *et al.*, 2006; Jungkunst *et al.*, 2012).

На территориях со значительным поступлением азота из атмосферы отмечается и более высокая эмиссия закиси азота (табл. 1, 2). Эти параметры коррелировали между собой с коэффициентом корреляции, равным 0.47 при $p = 0.05$ в хвойных лесах и 0.68 при $p = 0.01$ в лиственных. Значения r были рассчитаны по табл. 1, 2. При малом приходе азота из атмосферы происходит преимущественно сток закиси азота в почву, что и наблюдалось в канадской тайге (Matson *et al.*, 2009; Peichl *et al.*, 2010).

В Финляндии доминировали болота с низкой продукцией N_2O , от 0.19 до 0.4–2.7 кг N/га/год. На осушенных болотных массивах потери N_2O возрастали до 5–25 кг N/га/год. Различное отношение C:N торфа обеспечивало 5% изменений продукции N_2O , и 13% было связано с типом болот и характером болотной растительности (Alm *et al.*, 1999; Maljnen *et al.*, 2010; Ojanen *et al.*, 2010).

Измерение денитрификации ацетиленовым методом. В массивах хвойных лесов продуктивность денитрификации изменялась от 0.01 кг N/га/год в канадской тайге до 1.8–4.6 кг N/га/год в почвах катены под еловым лесом в России (табл. 3). Для кленово-буковых лесов с дерново-подзолистыми почвами денитрификационные потери варьировали от 0.016 до 40 кг N/га/год (Groffman, Tiedje, 1989). Процесс измеряли в лабораторных условиях в почвенных кернах. Средние из таких оценок являются весьма приближенными и, скорее всего, завышенными. Значительные расхождения в продуктивности денитрификации отмечены и в насаждении ольхи, составляющие 0.66–7.0 кг N/га/год (табл. 3). В лесах умеренного пояса Западной Европы и Северной Америки денитрификационные потери азота в хвойных массивах варьировали от 0.10 до 2.4 кг N/га/год, составляя в среднем 0.30 кг N/га/год. В лиственных насаждениях значения этого параметра были равны 0.30–28 и 3 кг N/га/год.

В масштабах планеты выделение закиси азота из почв лесов умеренного пояса ($n = 15$) и тропических лесов ($n = 22$) оценивают в 1 ± 0.4 и 3 ± 5 кг N/га/год (Oertel *et al.*, 2016).

В среднем потери азота при денитрификации в почвах лесов умеренной зоны, измеренные в атмосфере ацетилена (Barton *et al.*, 1999), соизмеримы с эмиссией оксидов азота (Regina *et al.*, 1998), но их соотношение изучено недостаточно.

Глобальное потепление и рост общей азотизации биосферы (Dai *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022), увеличение содержания CO_2 в атмосфере (Gineyts, Niboyet, 2023) изменяют микробную активность азотного цикла. Катаболические процессы начинают преобладать над анаболическими. Цикл азота смещается от микробной иммобилизации к усилению минерализации, нитрификации и денитрификации в наземных экосистемах (Dai *et al.*, 2020). По этим причинам поступление закиси азота из почв планеты в атмосферу возросло с 6.3 ± 1.1 Тг N/год в 1861 г. до 10 ± 2 Тг N/год в 2007–2016 гг. (Tian *et al.*, 2019).

Сезонная динамика денитрификации в лесных почвах и факторы ее определяющие. В широколиственном лесу Наббард-Брук (штат Нью-Гэмпшир, США) поток N_2O зимой (XII, I–III) составляет 12% годовой величины, весной (IV–V) – 14%, летом (VI–VIII) – 44% и осенью (IX–XI) – 30% (Groffman *et al.*, 2006б).

В горизонте почвы (A_0 – A_1) нетто-минерализация азота, нитрификация и денитрификация (измерение с ацетиленом) в смежные годы исследования были равны 11.9 и 21.9, 7.2 и 12.4, 0.14 и 0.65 г N/м²/год соответственно. Денитрификационные потери азота составляли в среднем 2% от нетто-минерализации и 3.6% от нитрификации (Groffman *et al.*, 2001).

В некоторых работах до 86% сезонных вариаций эмиссии N_2O и NO определялись гидротермическим режимом почвы, однако чаще сезонная динамика выделения этих газов в хвойных и лиственных лесах не была связана с этими параметрами. Во всех массивах отмечена отрицательная корреляция эмиссии N_2O с отношением C: N в лесных почвах с $r^2 = 0.87$ (Klemmedson *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 1988; Groffman *et al.*, 2006; Kitzler *et al.*, 2006; Pilegaard *et al.*, 2006). Содержание нитратов в минеральной почве смешанного леса коррелировало с сезонными изменениями эмиссии NO с $r^2 = 0.65$ (Теере *et al.*, 2000). В Нидерландах концентрации N_2O в почвенном воздухе уменьшались с опусканием уровня грунтовых вод (Tietema *et al.*, 1991). Регрессионные уравнения, учитывающие изменения температуры и влажности почвы, поступления азота из атмосферы, сезонного прироста фитомассы объясняли 67 и 50% сезонной эмиссии NO и N_2O в еловом лесу в Германии (Luo *et al.*, 2012).

В течение года максимальная эмиссия закиси азота лесными почвами (до 84% годовой величины) обычно отмечается весной и осенью, при чередовании замерзания и оттаивания (Goodroad, Kenney, 1984; Brumme *et al.*, 1999; Курганова и др., 2004; Hentschel *et al.*, 2008; Schmitt *et al.*, 2008; Goldberg *et al.*, 2010). Выделение N_2O из илестых почв происходит в 9 раз активнее, чем в супесях (Теере *et al.*, 2004). Лабораторные исследования не выявили какого-либо общего объяснения высокой эмиссии закиси азота из лесных почв в эти периоды.

Таблица 2. Эмиссия оксидов азота и молекулярного азота из почв лиственных лесов

Лесной фитоценоз	Географическое положение	кг N га ⁻¹ год ⁻¹				Источник
		N _{атм}	N ₂ O	NO	N ₂	
Дубово-буковый лес	Нидерланды	50	20			Tietema <i>et al.</i> , 1991 van Dijk, Duyzeret, 1999
Буковый лес	То же	35		0.05		
Широколиственный лес	Германия	40	1.4			Schulte-Bisping, Beese, 2003
Буковый лес	То же	24–40	0.4–1.3			Borken, Beese, 2005
То же	То же	20	0.17		0.71	Wolf, Brumme, 2003
То же	То же	20	3.0		0.51	
То же	То же	24	0.49			Jungkunst <i>et al.</i> , 2012
То же	То же	25	1.6–6.6	2.3–3.5	12.4	Butterbach-Bahl <i>et al.</i> , 2002.a
То же	Австрия	12	0.64	0.021		Kitzler <i>et al.</i> , 2006
Широколиственный лес	Германия	20	0.79	0.31		
Смешанный лес		20	2.0			Schulte-Bisping <i>et al.</i> , 2003, 2016
То же	То же	13	0.7			
Лиственный лес	Западная Европа	20	1.1	0.35		Pilegaard <i>et al.</i> , 2006
При осушении массива ольхи за 322 дня	Германия		72			Brumme <i>et al.</i> , 1999
После осушения			1–5			

Лесной фитоценоз	Географическое положение	кг N га ⁻¹ год ⁻¹			Источник
		N _{атм}	N ₂ O	NO	
Осиновый лес	Провинция Саскачеван, Канада	4	0.14		Matson <i>et al.</i> , 2009
Широколиственный лес	Штат Висконсин, США	8	0.89		Goodroad, Keeney, 1984
То же	Северо-восток США	10	0.1		Bowden <i>et al.</i> , 1990
То же	Штат Западная Вирджиния, США	11.5	0.18		Peterjohn <i>et al.</i> , 1998
То же	Штат Пенсильвания, США,	10	0.23		Bowden <i>et al.</i> , 2000
То же	Штат Нью-Гэмпшир, США	11	0.82		
Контроль	То же	11	0.24		Groffman <i>et al.</i> , 2006
Вариант с удалением снежного покрова	То же		0.63		
Смешанный лес	Штат Западная Вирджиния, США	10		0.012–0.018	Venterea <i>et al.</i> , 2004
То же	Штат Мэн, США	25–30		0.05–0.59	

При замерзании в почве могут быть незамерзшие пленки влаги, обволакивающие частицы с запасом питательных веществ. В этих микроагрегатах возможно образование и накопление N₂O. Замерзшая влага экранирует выход образовавшегося газа, который освобождается при оттаивании. Увеличение выхода закиси азота стимулируется повышением температуры и ростом доступного органического вещества (Курганова и др., 2004).

Изменения содержания кислорода в почве влияют на соотношение NO, N₂O и N₂ в общем потоке газов. Это позволяет объяснить кратковременное увеличение эмиссии N₂O из почвы после интенсивных дождей (Благодатский, 2011).

При измерении с ацетиленом только 50% вариаций процесса денитрификации были связаны с сезонными изменениями гидротермических параметров почвы, содержания нитратов и лабильного

$C_{\text{орг}}$ (Groffman *et al.*, 1989; Mogge *et al.*, 1998), однако в отдельных исследованиях нитраты были главным параметром, контролирующим денитрификацию (Merril, Zak, 1992). Рост содержания влаги в почве мог как увеличить активность денитрификации (Klemmedson *et al.*, 1997), так и оставить ее значения без изменения (Peterjohn *et al.*, 1998).

Регрессионное уравнение, включающее сезонные изменения влажности почвы, концентрации нитратов, денитрификационный потенциал и эмиссию CO_2 , описывало до 79% вариаций денитрификации (Vermes, Myrold, 1992). Добавление в регрессионную модель потенциальной активности денитрификационных ферментов (АДФ), отношения АДФ: С микробной биомассы объясняли до 96% изменений денитрификации. Интенсивность процесса возрастала с изменением механического состава от песчаных почв к глинистым и иристо-глинистым (Groffman, Tiedje, 1989).

В насаждении ольхи температура почвы коррелировала с процессами денитрификации (измерение с ацетиленом, $r^2 = 0.44$) и эмиссией N_2O ($r^2 = 0.64$). Несмотря на различие в продуктивности процесса у ольхи и бука, сезонная динамика денитрификации на обоих участках была близка (Mogge, 1998).

Потери N_2O и NO из осушенного лесного болота Финляндии (горизонт торфа 0–15 см) с мая по сентябрь составили 3.1 и 0.3 кг N/га. Выделение обоих газов было максимально при заполнении влагой 60–70% объема пор торфяного субстрата. Сезонная динамика выделения обоих газов была связана с содержанием нитратов, активностью нитрификации, эмиссией CO_2 и температурой почвы ($r = 0.28–0.4$). Добавки минерального азота и мочевины незначительно увеличивали эмиссию N_2O , но потери NO возрастали в 1.5–2 раза. Газообразные потери составляли 4% от минерализованного азота (Regina *et al.*, 1998).

Глобальный анализ проявления процесса показал, что микробная биомасса, pH, текстура, влажность и средняя годовая температура объясняли около 60% изменений активности денитрификации. Полагают, что содержание азота в почве и микробная биомасса являются наиболее сильными предикторами процесса (Li *et al.*, 2022).

Известны математические модели денитрификации в почве. Соответствие между экспериментальными и расчетными скоростями процесса изменялось от 75 до 150% (Barton, 1999). Отмечается, что сложные имитационные модели более точны, чем простые уравнения, основанные на коэффициентах выбросов оксидов азота. Так как эмиссию N_2 из почвы измерять сложно и дорого, предлагается использовать расчетное значение этого параметра, полученное в математических моделях (Del Grosso *et al.*, 2020).

Изменение экологических условий лесных экосистем и их влияние на денитрификацию. В почве

вырубки при удалении древостоев происходит накопление аммония, что стимулирует нитрификацию даже при росте анаэробноз почвы. Это обуславливает возрастание денитрификационных потерь на свежих вырубках как в хвойных, так и лиственных лесах умеренной зоны. У хвойных с денитрификацией терялось в среднем 0.3 кг N/га/год в лесу и 2.4 кг N/га/год на вырубке. У лиственных пород значения этих параметров составляли 3 и 5.4 кг N/га/год соответственно (Barton *et al.*, 1999). По данным обзорной работы (Zhang *et al.*, 2022), рубка до 2 раз увеличивает эмиссию N_2O из почв широколиственных лесов и незначительно изменяет этот параметр в хвойных и смешанных насаждениях. Процесс возвращается к исходному уровню через 4–6 лет после рубки (Barton *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2022).

В хвойном лесу в Финляндии отмечено поглощение закиси азота почвой вырубки в первый год после рубки и ее эмиссия во второй год, что связывают с увеличением в почве вырубки лабильного $C_{\text{орг}}$ (Saari *et al.*, 2009). На полуострове Новая Шотландия (Канада) вырубка смешанного леса не изменила поток закиси азота из почвы, составлявшего на вырубке и в лесу 0.027 ± 0.05 кг N/га с марта по ноябрь (Kellman, Kavanaugh, 2008).

Внесение минерального азота весьма часто стимулирует выделение закиси и оксида азота лесными почвами (Bowden *et al.*, 1991; Klemmedson *et al.*, 1997; Peterjohn *et al.*, 1998; Venterea *et al.*, 2004; Kitzler *et al.*, 2006) при единичных исключениях (Bowden *et al.*, 2000). Отмечается, что при высокой атмосферной нагрузке на водосборе со смешанным лесом может иметь место абиогенное образование оксида азота. Увеличение эмиссии NO может увеличить фитотоксичность озона в атмосфере и сдерживать накопление углерода фитоценозом как реакцию леса на увеличение поступления атмосферного азота и содержания CO_2 (Venterea *et al.*, 2004).

Добавление нитратов в почву широколиственного леса (штат Нью-Джерси, США) приводило к двойному увеличению эмиссии N_2O по сравнению с контрольными площадями. Добавление фосфатов в 1.6 раза уменьшало активность процесса на одних участках, но не изменило его значения на других (Ullah, Zinati, 2006).

Ухудшение дренажа часто увеличивает денитрификационные потери азота в лесу в 1.1–2.4 раза. В общих газообразных потерях азота происходит снижение доли N_2O на 25% в заболоченных лесах и на 70–90% в почвах с хорошим дренажем (Groffman, Tiedje, 1989; Merrill, Zak, 1992).

Удаление снежного покрова увеличивало эмиссию закиси азота из почвы до 6 раз в еловом лесу в Германии (Goldberg *et al.*, 2010) и в 2.6 раза в широколиственном лесу в США (табл. 2), но было недостоверно в кленово-буковом насаждении (штат Нью-Гэмпшир, США), где на участках без снега

Таблица 3. Продуктивность денитрификации в лесных почвах

Лесной фитоценоз, почва	Географическое положение	N_2O , кг N га ⁻¹ год ⁻¹	Источник
Еловый лес. Почва: торфяно-глеевая палево-подзолистая буроземная дерново-глеевая Хвойный лес	Тверская область, Россия	4 (V–IX) 2.4 1.8 4.6 0.01	Гришакина, 2007
Вырубка дугласии Насаждение ольхи Зрелый буковый лес Насаждение ольхи Кленово-буковый лес Хороший дренаж, участки 1, 2, 3 Почва: глинистая 1 илисто-глинистая 2 песчаная 3 Средний дренаж 1, 2, 3 Низкий дренаж 1, 2, 3 Кленово-дубовый лес Кленово-липовый лес Заболоченный кленовый лес	Провинция Британская Колумбия, Канада Штат Орегон, США Германия Штат Мичиган, США	0.66 (V–X) 0.66 0.4 7.0 10 18 0.6 11, 17, 0.8 24, 40, 0.5 0.014 (V–IX) 0.029 0.047	Gushon, Feller, 1989 Vermes, Myrold, 1992 Mogge <i>et al.</i> , 1999 Groffman, Tiedje, 1989 Merril., Zak, 1992

и контрольных площадях выделялось 0.12 ± 0.08 и 0.08 ± 0.06 г N/м²/год. Породный состав древостоев не влиял на продукцию закиси азота, составляющую на участках с сахарным кленом и желтой березой 0.074 ± 0.06 и 0.083 ± 0.041 г N /м²/год (Groffman *et al.*, 2006б).

В сосновом лесу возраст древостоев не коррелировал с продукцией N_2O (табл. 1). Выделение закиси азота возрастало с увеличением $C_{орг}$ в подстилке (Schulte-Bisping *et al.*, 2003).

В эксперименте увеличение видового разнообразия почвенной фауны незначительно увеличивало эмиссию CO_2 из почвы, но заметно снижало выделение N_2O , что может свидетельствовать о более полной денитрификации (Lubbers *et al.*, 2020).

Ранее в экспериментальных исследованиях почв природных зон европейской части России было показано, что скорость восстановления закиси азота была выше ее эмиссии. Это указывает, что основным продуктом денитрификации является молекулярный азот (Кромка и др., 1991). В нашей стране экспериментальных оценок эмиссии N_2 из лесных почв нет. Немногочисленные исследования эмиссии закиси азота в лесных и болотных экосистемах страны (Тверская область, Карелия) показали преимущественное поглощение закиси азота верхними горизонтами почв, что позволяет рассматривать эти экосистемы как природный сток для N_2O (Гришакина, 2007; Мамай и др., 2013; Комарова и др., 2015). Учитывая данные этих

исследований, а также низкое выделение и адсорбцию закиси азота в почвах таежных экосистем Скандинавии, Канады и США (Bowden *et al.*, 1990, 1991; Klemmedson *et al.*, 1997; Pilegaard *et al.*, 2006; Kellman, Kavanaugh, 2008; Matson *et al.*, 2009; Peichl *et al.*, 2010), логично предположить, что колоссальные по площади таежные леса России с низким приходом азота с осадками (особенно в Сибири и на Дальнем Востоке) (Меняйло и др., 2018) дают малый вклад в поступление азотсодержащих газов в атмосферу. К сожалению, для более точных оценок нет экспериментальных данных.

Выводы

1. Таким образом, поступление денитрификационных газов из лесных почв положительно коррелирует с $N_{атм}$, поддерживая высокий уровень процесса в лесах Западной Европы и меньший в лесных массивах Северной Америки, возвращая до 30% “атмосферного азота”. Отмечается и поглощение N_2O и NO в почвенном профиле.

2. На вырубках возможно увеличение газообразных потерь азота из почв по сравнению с лесом.

3. Денитрификационные потери азота составляют менее 5% от нетто-минерализованного азота в почвенном профиле в течение года.

4. Температура и увлажнение почвы, концентрации нитратов и органического вещества, отношение C:N в почве объясняют не более 50% сезонных изменений процесса денитрификации. Не

установлены параметры, эффективно контролирующие сезонную динамику процесса.

5. Поступление денитрификационных газов из лесных почв в атмосферу в основном представлено закисью азота и является неполным и заниженным из-за ограниченного количества выполненных измерений эмиссии NO, NO₂ и N₂, что снижает достоверность оценок суммарного газового потока.

6. Денитрификация остается одним из самых сложных для изучения процессов азотного цикла, с отсутствием оптимального метода ее измерения.

ЭТИЧЕСКОЕ ОДОБРЕНИЕ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор данной работы заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ананьева Н.А., Иващенко К.В., Стольников Е.В., Степанов А.Л., Кудяров В.Н. Особенности определения нетто-продуцирования N₂O почвами // Почвоведение. 2015. № 6. С. 702–714. <https://doi.org/10.7868/S0032180X15060027>
- Благodatский С.А. Микробная биомасса и моделирование цикла азота в почве. Автореферат диссертации д.б.н. (03.02.03, 03.02.13). Пушкино, 2011. 40 с.
- Гришакина И.Е. Особенности микробной трансформации азота в почвах южной тайги (на примере ЦЛГПБЗ). Автореферат диссертации к.б.н. (03.00.07, 03.00.27). М.: МГУ, 2007. 25 с.
- Климова А.Ю., Степанов А.Л., Манучарова Н.А. Особенности трансформации соединений азота и углерода в олиготрофной торфяной почве // Почвоведение. 2019. № 10. С. 1198–1202. <https://doi.org/10.1134/S0032180X19100046>
- Комарова Т.В., Васенев И.И., Поветкин В.А. Экологическая оценка почвенных потоков парниковых газов в сукцессиях зарастания залежи Центрально-Лесного заповедника // Материалы V конференции ЛАМП (Лаборатория агроэкологического мониторинга, моделирования и прогнозирования экосистем РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева) / Под ред. И.И. Васенева. М.: "Принт Формула", 2015. С. 90–96.
- Кромка М., Степанов А.Л., Умаров М.М. Восстановление закиси азота микробной биомассой в почвах // Почвоведение. 1991. № 8. С. 121–126.
- Кудяров В.Н. Эмиссия закиси азота из почв в условиях применения удобрений (аналитический обзор) // Почвоведение. 2020. № 10. С. 1192–1205. <https://doi.org/10.31857/S0032180X2010010X>
- Курганова И.Н., Tunc P., Lopes de Gurenjo B.O. Динамика выделения N₂O из пахотных и лесных почв при чередовании замерзания и оттаивания // Почвоведение. 2004. № 11. С. 1375–1384.
- Мамай А., Федорец Н., Степанов А. Процессы азотфиксации и денитрификации в подзолистых почвах хвойных и мелколиственных лесов средне-таежной подзоны Карелии // Лесоведение. 2013. № 1. С. 66–74.
- Меняйло О.В., Матвиенко А.И., Макаров М.И., Ченг Ш.-К. Роль азота в регуляции цикла углерода в лесных экосистемах // Лесоведение. 2018. № 2. С. 143–159. <https://doi.org/10.7868/S0024114818020067>
- Разгулин С.М. Цикл азота в экосистемах южной тайги Европейской России. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2022. 161 с.
- Реймерс Н.Ф. Природопользование. М.: Мысль, 1990. 639 с.
- Умаров М.М., Кураков А.В., Степанов А.Л. Микробиологическая трансформация азота в почве. М.: Геос, 2007. 137 с.
- Федорова Р.И., Милехина Е.И., Илюхина Н.И. О возможности метода газообмена для обнаружения жизни вне Земли // Известия АН СССР. Серия биологическая. 1973. № 6. С. 797–806.
- Alm J., Saarnio S., Nykanen H. Winter CO₂, CH₄ and N₂O fluxes on some natural and drained boreal peatlands // Biogeochemistry. 1999. V. 44. P. 163–186. <https://doi.org/10.1023/A:1006074606204>
- Ambus P., Zechmeister-Boltenstern S. Denitrification and N-Cycling in Forest Ecosystems. Biology of the Nitrogen Cycle. 2007. P. 343–358.
- Aurangojeb M., Klemetsson L., Rütting T., He H., Westlien P., Banzhaf S. Nitrous oxide emissions from Norway spruce forests on drained organic and mineral soil // Canadian Journal of Forest Research. 2017. V. 47. P. 1482–1487. <https://doi.org/abs/10.1139/cjfr-2016-0541>
- Barton L., Mclay C., Schipper L., Smith C. Annual denitrification rates in agricultural and forest soils: a review // Australian Journal of Soil Research. 1999. V. 37. P. 1079–1093.
- Borken W., Beese F., Brumme R., Lamersdorf N. Long-term reduction in nitrogen and proton inputs did not affect atmospheric methane uptake and nitrous oxide emission from a German spruce forest soil // Soil Biology & Biochemistry. 2002. V. 34. P. 181–51819.
- Borken W., Beese F. Control of nitrous oxide emissions in European beech, Norway spruce and Scots pine forests // Biogeochemistry. 2005. V. 76. P. 141–159. <https://doi.org/10.1007/s10533-005-2901-8>
- Bowden R.D., Steudler P.A., Mellilo J.M., Aber J.D. Annual nitrous oxide fluxes from temperate forest soils in the north eastern United States // Journal of Geophysical Research: Atmospheres. 1990. V. 95. P. 13997–14005.

- Bowden R.D., Steudler P.A., Mellilo J.M., Aber J.D. Effect of nitrogen additions on annual nitrous oxide fluxes from temperate forest soils in the northeastern United States // *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*. 1991. V. 96. P. 9321–9328.
- Bowden R.D., Rullo G., Stevens G.R., Steudler P.A. Soil fluxes of carbon dioxide, nitrous oxide, and methane at a productive temperate deciduous forest // *Journal Environmental Quality*. 2000. V. 29. P. 268–276. <https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900010034x>
- Brumme R., Borken W., Finke S. Hierarchical control of nitrous oxide emissions in forest ecosystems // *Global Biogeochemical Cycles*. 1999. V. 13. P. 1137–1148. <https://doi.org/10.1029/1999GB900017>
- Butterbach-Bahl K., Gasche R., Breuer L., Papen N. Fluxes of NO and N₂O from temperate forest type, deposition and of liming on the NO and N₂O emissions // *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 1997. V. 48. P. 79–90.
- Butterbach-Bahl K., Willibald G., Papen N. Soil core method for direct simultaneous determination of N₂ and N₂O emissions from forest soils // *Plant & Soil*. 2002a. V. 240. P. 105–116. <https://doi.org/10.1023/A:1015870518723>
- Butterbach-Bahl K., Gasche R., Willibald G., Papen N. Exchange of N-gases at the Hogwald Forest – A summary // *Plant & Soil*. 2002b. V. 240. P. 117–123.
- Butterbach-Bahl K., Baggs E., Dannenmann M., Kiese R., Zechmeister-Boltenstern S. Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls? // *Philosophical Transactions Royal Society Lond. B. Biol. Sci.* 2013. 368. P. 20130122. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0122>
- Corre M., Pennock D.J., Kessel C.V., Elliot D.K. Estimation of annual nitrous oxide emissions from transitional grassland-forest region in Saskatchewan Canada // *Biogeochemistry*. 1999. V. 44. P. 29–49. <https://doi.org/10.1023/A:1006025907180>
- Dai Z., Yu M., Chen H., Zhao H., Huang Y., Su W., Xia F. et al. Elevated temperature shifts soil N cycling from microbial immobilization to enhanced mineralization, nitrification and denitrification across global terrestrial ecosystems // *Global Change Biology*. 2020. V. 26. P. 5267–5276. <https://doi.org/10.1111/gcb.15211>
- Del Grosso S., Smith W., Kraus D., Massad R., Vogeler I., Fuchs K. Approaches and concepts of modelling denitrification: increased process understanding using observational data can reduce uncertainties // *Current Opinion in Environmental Sustainability*. 2020. V. 47. P. 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2020.07.003>
- van Dijk S., Duyzer J. Nitric oxide emissions from forest soils // *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*. 1999. V. 104. P. 1595–1596. <https://doi.org/10.1029/1999JD900195>
- Gineyts R., Niboyet A. Nitrification, denitrification, and related functional genes under elevated CO₂: A meta-analysis in terrestrial ecosystems // *Global Change Biology*. 2023. V. 29. P. 1839–1853. <https://doi.org/10.1111/gcb.16568>
- Goldberg S.D., Borken W., Gebauer G. N₂O emission in a Norway spruce forest due to soil frost: concentration and isotope profiles shed a new light on an old story // *Biogeochemistry*. 2010. V. 97. P. 21–30. <https://doi.org/10.1007/s10533-009-9294-z>
- Goodroad L., R. Keeney D. Nitrous Oxide Emission from forest, Marsh, and Prairie Ecosystems // *Journal Environmental Quality*. 1984. V. 13. P. 448–452.
- van Groenigen J., Huygens D., Boeckx P., Kuypers Th., Lubbers J., Rütting T., Groffman P. The soil N cycle: new insights and key challenges // *SOIL*. 2015. V. 1. P. 235–256. <https://doi.org/10.5194/soil-1-235-2015>
- Groffman P., Tiedje J. Denitrification in a north temperate forest soils: spatial and temporal patterns at the landscape and seasonal scales // *Soil Biology & Biochemistry*. 1989. V. 21. P. 613–620. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(89\)90053-9](https://doi.org/10.1016/0038-0717(89)90053-9)
- Groffman P., Driskoll C., Fachey T., Hardy J., Fitzhugh R., Tierney J. Effect of mild winter freezing on soil nitrogen and carbon dynamics in a northern hardwood forest // *Biogeochemistry*. 2001. V. 56. P. 191–213. <https://doi.org/10.1023/A:1013024603959>
- Groffman P., Altabet M., Boehlke J., Butterbach-Bahl K., David M., Firestone M., Giblin A., Kana T., Nielsen L., Voytek M. Methods For Measuring Denitrification: Diverse Approaches To A Difficult Problem // *Ecological Applications*. 2006a. 16 (6). P. 2091–2122. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2006\)](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2006))
- Groffman P., Hardy J., Driskoll C., Fachey T. Snow depth, soil freezing, and fluxes of carbon dioxide nitrous oxide and methane in a northern hardwood forest // *Global Change Biology*. 2006b. V. 12. P. 1748–1760. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2006.01194.x>
- Groffman P., Hardy J., Fashn-Kann S., Driskoll C., Cleavitt N., Fachey T., Fisk M. Snow depth, soil freezing and nitrogen cycling in a northern hardwood forest landscape // *Biogeochemistry*. 2011. V. 102. P. 223–238. <https://doi.org/10.1007/S10533-010-9436-3>
- Gushon G.H., Feller M.C. Asymbiotic nitrogen fixation and denitrification in a mature forest in coastal British Columbia // *Canadian Journal of Forest Research*. 1989. V. 19. P. 1194–2000.
- Hentschel K., Borken W., Matzner E. Repeated freeze-thaw events affect leaching losses of nitrogen and dissolved organic matter in a forest soil // *Journal Plant Nutrition Soil Science*. 2008. V. 17. P. 699–606. <https://doi.org/10.1002/JPLN.200700154>
- Jungkunst H., Bargsten A., Timme M., Glatzel S. Spatial variability of nitrous oxide emissions in unmanaged old-growth beech forest // *Journal Plant*

- Nutrition Soil Science. 2012. V. 175. P. 739–749.
<https://doi.org/10.1002/jpln.201100412>
- Kellman L., Kavanaugh K. Nitrous oxide dynamics in managed northern forest soil profiles: is production offset by consumption? // Biogeochemistry. 2008. V. 90. P. 115–128.
<https://doi.org/10.1007/s10533.008.9237.0>
- Kitzler B., Zechmeister-Boltnstern S., Holtermann C., Skiba U., Butterbach-Bahl K. Nitrous oxide emission from two beech forests subjected to different nitrogen loads // Biogeosciences. 2006. V. 3. P. 293–310.
<https://doi.org/10.5194/bg-3-293-2006>
- Klemmedson L., Klemmedson K.A., Maidan F., Weslien P. Nitrous oxide emission from Swedish forest soils in relation to liming and simulated increased N-deposition // Biology and Fertility of Soils. 1997. V. 25. P. 290–295.
<https://doi.org/10.1007/s003740050317>
- Li Z., Tang Z., Song Z., Chen W., Tian D., Tang S. et al. Variations and controlling factors of soil denitrification rate // Global Change Biology. 2022. V. 28. P. 2133–2145.
<https://doi.org/10.1111/gcb.16066>
- Llado S., Lopeiz-Mondejar R., Baldrian P. Forest Soil Bacteria: Diversity, Involvement in Ecosystem Processes, and Response to Global Change // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2017. V. 81 (2). e00063-16.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00063-16>
- Lubbers I., Berg M., De Deyn G., van der Putten W., van Groenigen J.W. Soil fauna diversity increases CO₂ but suppresses N₂O emissions from soil // Global Change Biology. 2020. V. 26. P. 1886–1898.
<https://doi.org/10.1111/gcb.14860>
- Luo G., Bruggemann N., Gasche W., Grote R., Butterbach-Bahl K. Decadal variability of soil CO₂, NO, N₂O, and CH₄ fluxes at the Högwald Forest, Germany // Biogeosciences. 2012. V. 9. P. 1741–1763.
<https://doi.org/10.5194/bg-9-1741-2012>
- Maljnen M., Hytonen J., Martikainen P.J. Cold-season nitrous oxide dynamics in a drained boreal peatland differ depending on land-use practice // Canadian Journal of Forest Research. 2010. V. 40. P. 565–572.
<https://doi.org/10.1139/X10-004>
- Matson A., Pennock D., Bedard-Hau A. Methane and nitrous oxide emissions from mature forest stands in the boreal forest, Saskatchewan, Canada // Forest Ecology & Management. 2009. V. 258. P. 1073–1083.
<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.05.034>
- Merril A., Zak D. Factors controlling denitrification rates in upland and swamp forest // Canadian Journal of Forest Research. 1992. V. 22. P. 1597–1604.
- Mogge B. Nitrous oxide emissions and denitrification N-losses from forest soils in the Bornhöved Lake region (Northern Germany) // Soil Biology & Biochemistry. 1998. V. 30. P. 703–710.
[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00205-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00205-8)
- Mogge B., Kaiser E.-A., Munch J.-C. Nitrous oxide emissions and denitrification N-losses from agricultural soils in the Bornhöved Lake region: influence of organic fertilizers and land-use // Soil Biology & Biochemistry. 1999. V. 31. P. 1245–1252.
[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00039-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00039-5)
- Oertel C., Matschullat J., Zurba K., Zimmermann F., Erasmí S. Greenhouse gas emissions from soils – A review // Chemie der Erde. 2016. V. 76. P. 327–352.
<https://doi.org/10.1016/j.chemer.2016.04.002>
- Ojanen P., Minkkinen K., Alm J., Penttilä T. Soil-atmosphere CO₂, CH₄ and N₂O fluxes in boreal forestry-drainage peatland // Forest Ecology & Management. 2010. V. 260. P. 411–421.
<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2010.04.036>
- Oremland R.S., Capone D.G. Use of “specific” inhibitors in biogeochemistry and microbial ecology // Advances in Microbial Ecology. 1988. V. 10. P. 285–383.
- Peichl M., Arain M.A., Ullan S., Moore T.R. Carbon dioxide, methane and nitrous oxide exchanges in an age-sequence of temperate pine forests // Global Change Biology. 2010. V. 16. P. 2198–2212.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.02066.x>
- Peterjohn W.T., McGervey R.J., Sexstone A.J., Christ M.J., Foster C.J., Adams M.B. Nitrous oxide production in two forested watersheds exhibiting symptoms of nitrogen saturation // Canadian Journal of Forest Research. 1998. V. 28. P. 1723–1732.
<https://doi.org/10.1139/cjfr-28-11-1723>
- Pilegaard C., Skiba U., Ambus P., Beier C., Brüggemann N., Butterbach-Bahl K. et al. Factors controlling regional differences in forest soil emission of nitrogen oxides (NO and N₂O) // Biogeosciences. 2006. V. 3. P. 651–661.
<https://doi.org/10.5194/bg-3-651-2006>
- Raivonen M., Bonn B., Sanz M., Vesala T., Kulmala M., Hari P. UV-induced NO_x emissions from Scots pine: Could they originate from photolysis of deposited HNO₃? // Atmospheric Environment. 2006. V. 40. P. 6201–6213.
<https://doi.org/10.14214/df.71>
- Regina R., Mykanen H., Majanen M., Silvola J., Martikainen P.J. Emissions of N₂O and NO and net nitrogen mineralization in a boreal forested peatland treated with different nitrogen compounds // Canadian Journal of Forest Research. 1998. V. 28. P. 132–140.
<https://doi.org/10.1139/x97-198>
- Saari P., Saarnio S., Kukkonen J., Akkanen J., Heinonen J., Saari V., Alm J. DOC and N₂O dynamics in upland and peatland forest soils after clear-cutting, and soil preparation // Biogeochemistry. 2009. V. 94. P. 217–231.
<https://doi.org/10.1007/s10533.009.9320.1>
- Schmidt J., Conrad R., Seiler W. Emission of nitrous oxide from temperate forest soils into the atmosphere // Journal Atmospheric Chemistry. 1988. V. 6. P. 95–115.
<https://doi.org/10.1007/BF00048334>
- Schmitt A., Glaser W., Borken W., Matzner E. Repeated freeze-thaw cycles changed organic matter quality in a temperate forest soil // Journal Plant

- Nutrition Soil Science. 2008. V. 17. P. 707–718.
<https://doi.org/10.1002/jpln.200700334>
- Schulte-Bisping H., Brumme R., Priesack E. Nitrous oxide emission inventory of German forest soils // Journal of Geophysical Research: Atmospheres. 2003. V. 108. P. 41–32.
<https://doi.org/10.1029/2002JD002292>
- Schulte-Bisping H., Beese F. N-fluxes and N-turnover in a mixed beech–pine forest under low N-inputs // European Journal of Forest Research. 2016. V. 135. P. 229–241.
<https://doi.org/10.1007/s10342-015-0931-x>
- Teepe R., Brumme R., Beese E. Nitrous oxide emissions from frozen soils under agricultural, fallow and forest land // Soil Biology & Biochemistry. 2000. V. 32. P. 1807–1810.
[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00078-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00078-X)
- Teepe R., Beese R., Ludwig B. Emissions of N₂O from soils during cycles of freezing and thawing and the effects of soil water, texture and duration of freezing // Soil science. 2004. V. 55. P. 357–362.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2004.00602.x>
- Tian H., Yang J., Xu R., Lu C., Canadell J., Davidson E. et al. Global soil nitrous oxide emissions since the pre-industrial era estimated by an ensemble of terrestrial biosphere models: Magnitude, attribution, and uncertainty // Global Change Biology. 2019. V. 25. P. 640–659.
<https://doi.org/10.1111/gcb.14514>
- Tietema A., Bouten W., Wartenberg P.E. Nitrous oxide dynamics in an oak-beech forest ecosystem in the Netherlands // Forest Ecology & Management. 1991. V. 44. P. 53–61.
- Venterea R., Groffman P., Castro M., Verchot L. et al. Soil emissions of nitric oxide in two forest watersheds subjected to elevated N inputs // Forest Ecology & Management. 2004. V. 196. P. 335–349.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(04\)00238-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(04)00238-5)
- Vermes J., Myrold D. Denitrification in forest soils of Oregon // Canadian Journal of Forest Research. 1992. V. 22. P. 504–512.
- Ullah S., Zinati G. Denitrification and nitrous oxide emissions from riparian forests soils exposed to prolonged nitrogen runoff // Biogeochemistry. 2006. V. 81. P. 253–267.
<https://doi.org/10.1007/s10533-006-9040-8>
- Wolf I., Brumme R. Dinitrogen and nitrous oxide formation in beech forest floor and mineral soils // Soil Science Society America Journal. 2003. V. 67. P. 1862–1868.
<https://doi.org/10.2136/sssaj2003.1862>
<https://doi.org/10.1111/gcb.15791>
- Wu Y-F., Whitaker J., Toet S., Bradley A., Davies C., McNamara N. Diurnal variability in soil nitrous oxide emissions is a widespread phenomenon // Global Change Biology. 2021. V. 27. P. 4950–4966.
<https://doi.org/10.1111/gcb.15791>
- Xu H., Yu M., Cheng X. Abundant fungal and rare bacterial taxa jointly reveal soil nutrient cycling and multifunctionality in uneven-aged mixed plantations // Ecological Indicators. 2021. V. 129. 107932.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107932>
- Zhang H., Tang C., Berninger F., Bai S., Wang H., Wang Y. Intensive forest harvest increases N₂O emission from soil: A meta-analysis // Soil Biology & Biochemistry. 2022. V. 172. 108712.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108712>

Emission of gaseous nitrogen oxides in soils of boreal forests (review)

S. M. Razgulin¹, @

*Institute of Forest Science RAS,
 st. Sovetskaya d. 21, Uspenskoe village, Odintsovsky district, Moscow region, 143030 Russia*

@ e-mail: kriador@yandex.ru

Denitrification losses of nitrogen-containing gases in the biome of boreal forests are discussed. In the soils of coniferous and deciduous forests of Western Europe, 0.57 ± 0.2 and 1.0 ± 0.2 kg N-N₂O/ha/year are lost during denitrification. In North America this figure was 0.35 ± 0.29 kg N-N₂O/ha/yr for all stands. The emission of N₂O from forest soils correlated with the input of nitrogen from the atmosphere with $r = 0.47$ in coniferous forests and with $r = 0.68$ in deciduous plantations, returning to the atmosphere up to 30% of the nitrogen supplied with atmospheric precipitation. With a high input of nitrogen from the atmosphere, the emission of nitrogen-containing gases reached 20 kg N/ha/yr. Of these, NO, N₂O, and N₂ accounted for 21, 15, and 64%. Measurements of NO and especially N₂ emissions remain very rare, leading to incomplete estimates of denitrification losses. Denitrification remains the most complex process in the nitrogen cycle, with no definitive methods for measuring it.

Keywords: nitrification, denitrification, precipitation nitrogen, emission of nitrogen-containing gases, forest soils

КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ФОРМИРОВАНИЯ ОКОН В ПОЛОГЕ СТАРОВОЗРАСТНОГО ШИРОКОЛИСТВЕННОГО ЛЕСА

© 2024 г. А. М. Портнов*, @, М. П. Шашков**, В. Н. Шанин*

*Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН – обособленное подразделение федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Институтская, 2, Пушкино, 142290 Россия

**Карагандинский государственный университет имени академика Е. А. Букетова, Университетская, 28, Караганда, 100024 Казахстан

@E-mail: alekseyporntnow@gmail.com

Поступила в редакцию 14.11.2022 г.

После доработки 15.05.2023 г.

Принята к публикации 15.05.2023 г.

Проведена количественная и качественная оценка динамики образования разрывов в пологе малонарушенного старовозрастного полидоминантного широколиственного леса на постоянной пробной площади в заповеднике «Калужские засеки». По данным аэрофотосъемки леса в 2018 и 2021 гг. были получены цифровые модели высот, по которым построены схемы окон нескольких высотных классов. Полученные схемы были экспертно проанализированы с использованием ортофотопланов данных съемок и оценены площади окон. Проведено выборочное наземное обследование окон и регрессионный анализ связи относительной площади окон с видовым составом древостоя по данным первичного перечета. Показано, что фенофаза во время съемки может существенно изменять оценку площадей окон, а высота древостоя в окне не может служить надежным показателем его возраста. Также было обнаружено, что аэрофотосъемка позволяет выявить более сложную оконную структуру, чем наземные исследования.

Ключевые слова: ветровальные окна, оконная динамика, заповедник «Калужские засеки», ортофотоплан, дистанционные методы, аэрофотосъемка, цифровая модель высот

DOI: 10.31857/S1026347024010136, **EDN:** LKQAXW

Современная популяционная экология рассматривает разрывы в пологе древостоев (окна) как важный структурный элемент лесных экосистем. Это нашло выражение в концепциях гэп-мозаики (Watt, 1947; Коротков, 1991; McCarthy, 2001) и мозаично-циклической концепции экосистем (The mosaic-cycle concept..., 1991; Смирнова, 1998), которые предполагают, что окна являются необходимой частью цикла естественного лесовозобновления (Smirnova *et al.*, 2017; Feldman *et al.*, 2018; Ross *et al.*, 2022). Окна обеспечивают некоторым светолюбивым видам, неспособным длительное время расти под пологом, возможность возобновления, а теневыносливым – возможность выйти в первый ярус. Понимание особенностей оконной динамики необходимо для анализа пространственной неоднородности лесного покрова, являющейся ключевым фактором поддержания устойчивого функционирования лесных экосистем, сохранения их биологического разнообразия и, как следствие, способности к реализации основных экосистемных функций (Lukina *et al.*, 2021).

Использование исключительно традиционных методов наземного обследования древостоев связано с большими трудовыми и временными затратами (Condit, 1998; Gardner *et al.*, 2008), поэтому в современных исследованиях активно применяются дистанционные методы. Для этого используются данные спутниковой съемки (Bastin *et al.*, 2017; Sturm *et al.*, 2022) и аэрофотосъемки с использованием пилотируемых летательных аппаратов (Vierling *et al.*, 2008), но подобные способы имеют определенные ограничения как по стоимости, так и по характеристикам изображения (Wulder *et al.*, 2004; Loarie *et al.*, 2007; Koh, Wich, 2012; Paneque-Gálvez *et al.*, 2014). Более привлекательной альтернативой в локальных исследованиях, проводимых на относительно небольших площадях, являются БПЛА (беспилотные летательные аппараты) (Rango *et al.*, 2009; Whitehead, Hugenholtz, 2014; Whitehead *et al.*, 2014; Pajares, 2015). Они используются для того, чтобы отслеживать изменения лесного покрова (Hansen *et al.*, 2013; Nijland *et al.*, 2015), получать данные о его густоте (Crowther *et al.*, 2015), высоте полога (Simard

et al., 2011; Nijland *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016), запасах углерода (Saatchi *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014) и структуре растительности (Getzin *et al.*, 2012; Dandois, Ellis, 2013; Puliti *et al.*, 2015).

В качестве результата дистанционного зондирования могут рассматриваться как плотные облака точек и цифровые модели высот (Mohan *et al.*, 2017; Otero *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2022), так и растровые композитные изображения (ортофотопланы) (Li *et al.*, 2017; Branson *et al.*, 2018), для интерпретации которых зачастую привлекаются искусственные нейронные сети (Sylvain *et al.*, 2019).

В исследованиях оконной динамики применяются такие наземные методы, как трансекты (Широков, 2005), дендроэкологический анализ (Hobi *et al.*, 2015), полусферическая съемка (Jonckheere *et al.*, 2005). Из дистанционных методов применяются сканирование лидаром (Verakomma *et al.*, 2012), анализ спутниковых снимков (Barton *et al.*, 2017) и аэрофотосъемка с помощью БПЛА (Wang *et al.*, 2015; Getzin *et al.*, 2012). Было показано, что при аэрофотосъемке происходит существенно меньше пропусков окон (ложноотрицательных результатов), чем при использовании наземных методов, хотя несколько увеличивается количество ошибочно распознанных окон (ложноположительных результатов) (Fox *et al.*, 2000).

Цель данного исследования — сравнить оценку оконной динамики участка малонарушенного широколиственного леса, полученную с помощью аэрофотосъемки, с оценкой, полученной наземными методами. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи: (1) построение на основе материалов аэрофотосъемки цифровых моделей высот древесного полога на постоянной пробной площади для выделения окон; (2) выявление оконной динамики древостоя на основе анализа материалов аэрофотосъемки, полученных в разное время; (3) сравнение размеров окон, выявленных наземными и дистанционными методами; (4) выявление связи между видовым составом первого яруса древостоя 30-летней давности и суммарной площадью окон в настоящее время.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Краткая характеристика района исследований. Заповедник “Калужские засеки” находится на юго-востоке Калужской области в пределах Русской платформы, в северо-западной части Среднерусской возвышенности на водоразделе рек Ока и Вытебеть (приток р. Жиздра). Преобладающие высоты 150–250 м н.у.м., наивысшая точка — 275 м. Рельеф образован в основном пологохолмистым покровом ледниковой морены, эрозионный, густо расчлененный овражно-балочной и речной сетью, состоящей из левых притоков реки Вытебеть. На территории заповедника представлены в основном

светло-серые лесные почвы, в долине р. Вытебеть — дерново-среднеподзолистые и дерново-слабоподзолистые почвы (Бобровский, Ханина, 2000).

Климат умеренно-континентальный с четко выраженными сезонами года. Среднегодовая температура +4.4°C, наиболее теплый месяц — июль (средняя температура +18°C), наиболее холодный — январь (средняя температура –10°C), средняя относительная влажность воздуха — 66–74%. Среднегодовое количество осадков — 662 мм (от 450 до 700 мм; максимальное количество осадков выпадает в июле, минимальное — в декабре и феврале). Снеготаяние начинается в среднем 29 марта. Преобладают западные и юго-западные ветры. Среднегодовое барометрическое давление — 746.5 мм рт. ст. (Veselov *et al.*, 2021).

Заповедник состоит из двух участков. На территории южного участка, где проводились исследования, сохранились уникальные массивы старовозрастных полидоминантных широколиственных лесов. Эти леса являются частью Заокской засечной черты, линии обороны Московского государства в XVI–XVIII вв. (Бобровский, Ханина, 2000; Бобровский, 2002). Заповедник “Калужские засеки” является одним из наименее нарушенных широколиственных восточноевропейских лесных массивов.

Постоянная пробная площадь в заповеднике “Калужские засеки” заложена на южном участке заповедника, в старовозрастном полидоминантном широколиственном лесу в 1986–1988 гг. под руководством проф. О. В. Смирновой и д.б.н. Р. В. Попадюка. Размер пробной площади составляет 10.8 га (200 × 540 м). Она имеет прямоугольную форму и разделена на 11 полос равной ширины (200 × 40 м) и полосу № 12 размером 200 × 100 м. Площадь ориентирована длинной стороной по оси север — юг с отклонением от направления на истинный север в 6 градусов к западу. Древостой имеет многоярусную структуру и сформирован *Quercus robur* L., *Tilia cordata* Mill., *Acer platanoides* L., *Acer campestre* L., *Ulmus glabra* Huds., *Fraxinus excelsior* L., *Betula* L. (идентификация до вида не проводилась) и *Populus tremula* L.

В настоящее время старейшие деревья *Q. robur* имеют возраст более 300 лет, а максимальный возраст деревьев других видов более 150 лет. Сомкнутость первого яруса древостоя составляет 60%, а среднее покрытие кустарникового яруса — 40% (Smirnova *et al.*, 2017). *Corylus avellana* (L.) H. Karst часто доминирует в кустарниковом ярусе: по оценкам, возраст кустарников превышает 200 лет, а возраст отдельных стволов — более 50 лет. *Euonymus europaeus* L., *Euonymus verrucosus* Scop., *Lonicera xylosteum* L. и *Prunus padus* L. распространены в подлеске наряду с подростом *T. cordata*, *U. glabra*, *A. campestre* и *A. platanoides*.

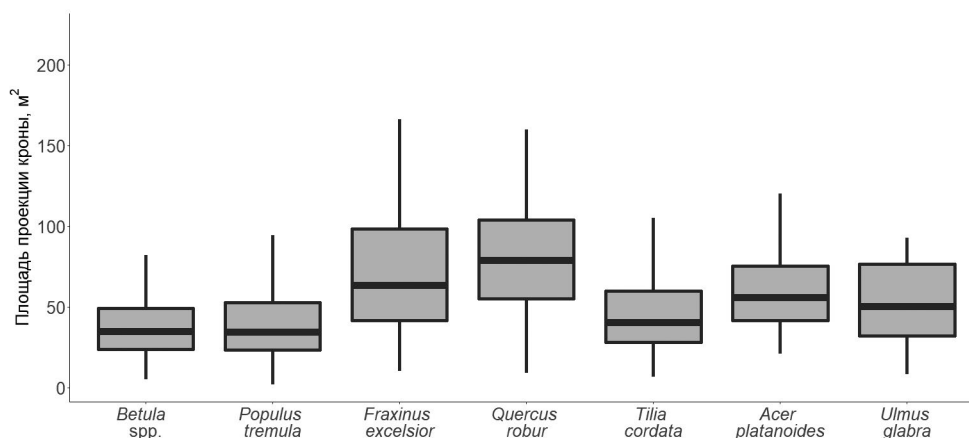


Рис 1. Площади проекций крон деревьев первого яруса разных видов по архивным данным (перечет 1986–1988 гг.). Нижняя граница бокса – 1-й квартиль, верхняя – 3-й; толстой горизонтальной линией обозначен 2-й квартиль (медианное значение); “усы” показывают размах значений.

Среднее проективное покрытие травянистого яруса составляет 65%. Наиболее распространены *Aegopodium podagraria* L., *Asarum europaeum* L., *Lamium galeobdolon* (L.) L. subsp. *galeobdolon* Huds., *Pulmonaria obscura* Dumort., *Rubra holostea* (L.) M. T. Sharples & E. A. Tripp, *Mercurialis perennis* L., *Milium effusum* L., *Dryopteris carthusiana* (Vill.) Н. Р. Fuchs и другие типичные неморальные виды. Также часто встречаются нитрофильные виды *Onoclea struthiopteris* (L.) Roth, *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., *Urtica dioica* L. и *Lunaria rediviva* L. Обильно представлены эфемероиды: *Anemonoides ranunculoides* L. (Holub), *Ranunculus ficaria* L., *Gagea lutea* (L.) Ker Gawl., *Gagea minima* (L.) Ker Gawl., *Corydalis solida* (L.) Clairv., *Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Körte, *Corydalis marschalliana* (Willd.) Pers., *Allium ursinum* L. (Shashkov et al., 2022).

При первичном учете в 1986–1988 гг. на пробной площади были учтены и картографированы все деревья с диаметром ствола > 5 см на высоте 1.3 м, а также отдельные кусты *C. avellana*. Учет производился независимо от жизненного статуса: мертвые деревья, как стоящие, так и упавшие, также учитывались. Для каждого дерева определяли вид, жизненный статус (высокая, нормальная, пониженная, низкая жизненность, погибшее сухостойное, пеня, упавшее), онтогенетическое состояние. Измеряли диаметр ствола, выборочно измеряли некоторые другие характеристики (Smirnova et al., 2017). Для каждого дерева были определены локальные декартовы координаты с помощью двух измерительных лент. Одна лента натягивалась параллельно границе полосы, а вторая – перпендикулярно первой по направлению к дереву. Таким образом, после учета радиуса ствола были получены относительные координаты каждого дерева в системе, точкой отсчета которой служит северо-западный угол постоянной пробной площади.

В 2016–2018 гг. проведен повторный переучет под руководством проф. М. В. Бобровского. В этом переучете для каждого учетного дерева отмечали жизненный статус (живое или мертвое), у живых деревьев измеряли диаметр ствола. В переучет были добавлены новые деревья, достигшие диаметра ствола на уровне груди 5 см (Shashkov et al., 2022); из-за сложностей с идентификацией кустов *C. avellana* и общим объемом работы этот вид в переучет включен не был.

Анализ материалов аэрофотосъемки. Окнами называются разрывы в пологие спелого древостоя, возникшие в результате вывала деревьев первого яруса. Для анализа площади ветровальных окон и их распределения по высотным классам использовали два ортофотоплана, полученных на основе материалов аэрофотосъемки при помощи квадрокоптера (30 апреля 2018 г. и 4 июня 2021 г.). Определение размеров ветровальных окон по данным аэрофотосъемки осуществляли в несколько шагов. Сначала по полученным фотографиям в программе Agisoft Metashape (Agisoft LLC, 2021) строили плотные облака точек и цифровые модели поверхности (Digital elevation model, DEM).

На следующем этапе обработки данных определяли оптимальное разрешение DEM. Для этого анализировали число окон, выделенных при разном разрешении модели (30, 50, 75, 100 см/пиксель). Учитывали общее число выделенных окон, размер самого большого окна и число окон площадью до 25 м². Последнее значение использовали как порог шума в модели, разрывы в пологие меньшей площади интерпретировали как артефакты. Значение в 25 м² было определено экспертно, исходя из распределения размеров крон деревьев, измеренных при закладке постоянной пробной площади (рис. 1). Такое значение соответствует

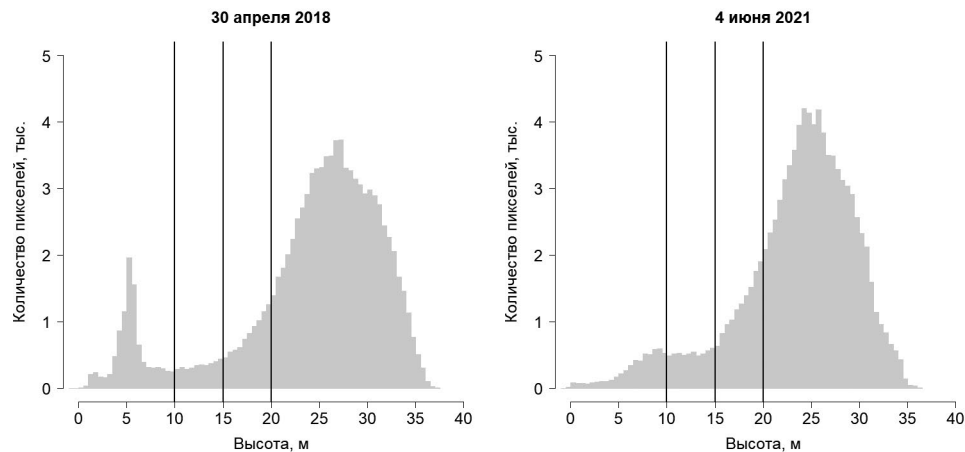


Рис 2. Гистограммы распределения нормированных высот пикселей для двух разновременных съемок. Вертикальными линиями показаны пороговые значения высоты для выделения разных классов окон.

минимальной площади проекции кроны для большинства видов рассматриваемых деревьев первого яруса древостоя. В результате вычислительных экспериментов оптимальное разрешение файла DEM оценено в 30 см/пиксель. Такое разрешение не снижает существенно качество изображения, по сравнению с более подробными разрешениями, но при этом значительно сокращает число артефактов обработки.

Далее полученные DEM с разрешением 30 см/пиксель обрабатывали в программе QGIS (QGIS development team, 2021) с помощью “Калькулятора растров”. Сначала нормировали высоты пикселей: из высоты каждого пикселя вычитали минимальную высоту DEM, таким образом высоты переводили из системы отсчета, связанной с уровнем моря, в локальную. Затем строили и анализировали гистограммы распределения высот для выделения пороговых значений высоты для разных классов древесной растительности (полога леса и окон разной стадии зарастания).

Одним из критериев закрытия окна является достижение деревьями в окне 2/3 высоты полога (Tugrell, Crow, 1994). В нашем случае средняя высота полога составляет около 30 м. Поскольку

закрытое окно становится трудно выделить, мы приняли высоту 20 м как минимальную высоту полога и не рассматривали участки древостоя высотой более 20 м как окна. Участки древостоя высотой 0–20 м были разделены нами на 3 класса согласно наблюдаемым на гистограммах кластерам (рис. 2). Высотный класс 0–10 м соответствует слабо заросшим окнам и создает в левой части гистограммы хорошо заметный пик. Класс 10–15 м соответствует частично заросшим окнам. Из гистограммы распределения высот пикселей видно, что в пределах этого класса деревья разной высоты встречаются с одинаковой частотой, что, вероятно, связано с интенсивной конкуренцией между деревьями в процессе выхода в полог. Классу 15–20 м соответствуют окна на поздних стадиях зарастания, в которых самые высокие деревья уже начинают доминировать над другими и скрывают последние при аэрофотосъемке.

Затем DEM разбивали на классы в соответствии с определенными по гистограммам пороговыми значениями высоты. Для оценки оконной динамики древостоев за 3 года для каждого срока съемки рассчитывали общие площади окон, выделенных в каждом классе (табл. 1). Для выявления окон, образовавшихся за трехлетний период, из векторного слоя с окнами, детектированными по съемке от 4 июня 2021 г., вычитали слои, полученные по съемке от 30 апреля 2018 г. Далее экспертно анализировали полученный слой с использованием разновременных ортофотопланов. В ходе этого анализа по ортофотопланам визуально оценивали принадлежность полигонов к новым окнам (по присутствию на самом позднем снимке лежащих деревьев) или же к артефактам обработки. По результатам анализа оценивали общее число окон, образовавшихся за 3 года. Построена схема

Таблица 1. Площади окон разных классов, оцененные по моделям высот

Дата съемки	Площади выделенных по высоте классов, м ²			Общая площадь, м ²
	< 10 м	10–15 м	15–20 м	
30.04.2018	19374.1	2547.3	10780.2	32701.6
04.06.2021	5428.3	4285.2	11958.8	21672.3

пробной площади с разделением территории на 3 класса: новые окна (образовавшиеся за период 2018–2021 гг.), окна, образовавшиеся до 2018 г., и полог леса (рис. 3б).

Кроме того, мы провели регрессионный анализ зависимости суммарной площади окон высотного класса до 10 метров в каждой полосе от видового состава первого яруса древостоя тех же полос (по данным перечета 1986–1988 гг.). Высотный класс 15–20 м был исключен нами из регрессионного анализа.

Наземные полевые обследования. Кроме того, на постоянной пробной площади проведено выборочное картографирование окон наземными методами для определения формы и размера. В качестве опорной точки для измерений внутри ветровального окна выбирали ориентир. Обычно для этого выбиралось одно из учетных деревьев. В случае отсутствия поблизости от геометрического центра окна стоящих деревьев использовали визуально различимый на ортофотоплане крупный валеж с записанными координатами. Далее от данной опорной точки производили измерение расстояний до границ окна по 8 магнитным азимутам (от 0 до 360°, с шагом в 45°), получая таким образом полярные координаты (азимут – расстояние) вершин соответствующего полигона. Границы окна определялись нами экспертно, по границам проекций крон деревьев первого яруса. После этого внутри окна измеряли высоты и записывали номера (в случае отсутствия номеров записывали ориентиры, позволяющие установить расположение) предположительно самых заметных на аэрофотоснимках деревьев. Расстояния до границ окон и высоты деревьев измерялись с помощью лазерного дальномера-угломера Laser Technology TruPulse 360B. Всего картографировано 11 окон разного размера, возраста и состава подраста (подлеска). Более подробно методика описана в предшествующей работе (Портнов и др., 2021).

Площади окон, выделенных наземным методом и с помощью аэрофотосъемки, сравнивались путем сопоставления площадей соответствующих им полигонов в программе QGIS. Для окон, измеренных наземным методом, полигоны строились путем перевода полярных координат в прямоугольные. Для географической привязки использовали координаты опорной точки. Для окон, выявленных с помощью анализа материалов аэрофотосъемки, использовались полигоны, выделенные с помощью анализа DEM. Следует отметить, что одному наземному окну на DEM могли соответствовать оконные полигоны нескольких высотных классов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Древостой на постоянной пробной площади неоднороден и имеет сложную как вертикальную, так

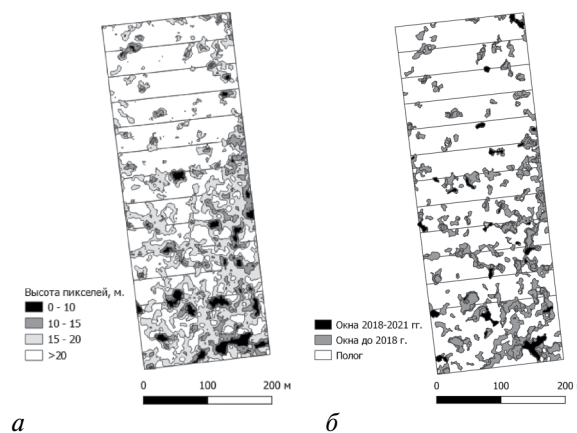


Рис. 3. План постоянной пробной площади на 4 июня 2021 года с разделением территории на полог леса (высота > 20 м) и окна возобновления разных классов высоты (а); план постоянной пробной площади с разделением древесной растительности на 3 класса (б).

и горизонтальную структуру, что характерно для древостоев, которые развиваются естественным путём в течение нескольких поколений жизни деревьев.

На рис. 3а представлен план постоянной пробной площади, построенный по данным аэрофотосъемки в июне 2021 г., с разделением территории на полог леса и окна возобновления разной давности, выделенных на основе выбранных пороговых значений высоты.

Оценка динамики изменения площади полога леса и разрывов в пологе (окон и парцелл возобновления) на основе аэрофотосъемки. В зависимости от времени съемки варьирует как общая площадь, так и площади отдельных классов. Общая площадь окон на пробной площади оценивается в среднем в $25187.0 \pm 5514.7 \text{ м}^2$, что составляет удельную площадь окон в $2332.1 \pm 510.6 \text{ м}^2 \text{ га}^{-1}$, или 18.2–28.4% от общей площади. Высокая вариация оцененных площадей связана прежде всего с разными фенофазами во время проведения съемки. В июне (съемка 2021 г.), после распускания листьев, большая часть выделенной “оконной” площади приходится на класс 15–20 м, а в апреле (съемка 2018 г.), когда листва в значительной степени отсутствует, на класс < 10 м.

Основываясь на полученных результатах, можно заключить, что для выделения окон с помощью данной методики следует использовать материалы аэрофотосъемки в период полного распускания листьев, т.е. от поздней весны до конца лета. Для корректного сравнения количества окон в разные годы необходимо использовать серию снимков, полученных в один и тот же сезон (желательно

летний). В работе (Barton *et al.*, 2017), где дистанционными методами исследовались разрывы полога в дубовых и буковых лесах, отмечается также, что имеет значения высота солнца над горизонтом в момент проведения съемки: при малой высоте наблюдается затенение периферийных участков крон деревьев, мешающее точно оценить форму окон. В то же время, когда солнце находится высоко над горизонтом, могут не обнаруживаться более мелкие окна неправильной формы.

Результаты детектирования новых окон на основе разновременных моделей высот и ортофотопланов показали, что с 2018 по 2021 г. в результате падения деревьев в пологе леса образовалось 25 новых окон. Сопоставление с результатами детектирования по модели высот показало, что новые окна относились к разным высотным классам (до 10 м, 10–15 м и 15–20 м). Данное предположение подтверждается результатами наземных обследований окон. Так, высота растущих в окнах деревьев составляет от 1.5 до 23.7 м (высотой более 20 м обладают отдельные деревья внутри окна). Этот результат показывает, что высота древесной растительности внутри окна не является индикатором его возраста. Вероятно, в ряде случаев окна высотных классов 10–15 и 15–20 метров являются не окнами в поздней стадии зарастания, а сформированы вторым ярусом древостоя, не затронутым при вывале деревьев верхнего яруса. Кроме того, во многих окнах с древесной растительностью высотой до 10 м обнаружено значительное количество *C. avellana*, которая формирует в подлеске свой “квазиполог”, препятствующий возобновлению древостоя и удерживающий окно в данном классе в течение длительного времени (возможно, десятилетия). В работе (Verakomta *et al.*, 2012), посвященной канадским хвойным лесам, указывается, что небольшие разрывы в пологе могут смыкаться в течение относительно небольшого срока (около 73% площади малых окон (размером 5–10 м²) закрылось в течение пяти лет), в то время как большие окна имеют тенденцию сохранять площадь в течение длительного времени или даже расширяться и менять форму за счёт последующих вывалов деревьев по границам окон.

Выяснено, что аэрофотосъемка позволяет выявить значительно более сложную структуру окон, чем наземные исследования. На цифровой модели высот (рис. 3а) видно, что окна часто переходят одно в другое через узкие перешейки, имеют небольшие вкрапления окон другого высотного класса. Участки древостоя в классе высот 15–20 м объединяются в масштабную лабиринтоподобную структуру, охватывающую практически всю южную половину постоянной пробной площади. Несколько картографированных нами окон находятся в пределах подобной структуры без возможности выделения четких границ, и точная оценка

их площади по материалам аэрофотосъемки не представляется возможной. В большинстве остальных случаев для оценки площади окон из расчета приходится исключить участки древостоя высотой 15–20 м.

В исследовании многоярусного разновозрастного букового леса (Hobi *et al.*, 2015) разрывы полога, картографированные с помощью дистанционных методов, также лишь частично совпали с результатами, полученными в ходе наземной инвентаризации. Авторы отмечают, что выявленные наземными методами окна чаще относились к крупным размерным классам, чем при использовании дистанционных методов. Авторы объясняют это, во-первых, различиями в методах выделения окон (при использовании наземных методов они считали окном древостой высотой не более 1/3 от высоты полога, а при использовании дистанционных методов — только те участки, где непосредственно видна поверхность) и, во-вторых, тенденцией небольших окон образовывать кластеры, из-за чего выборка наземных обследований могла оказаться нерепрезентативной.

Вероятно, участки древостоя высотного класса 15–20 м более продуктивно рассматривать как часть полога. По результатам предварительного регрессионного анализа мы сочли окна высотного класса 10–15 м вносящими искажения в получаемые результаты. Мы предполагаем, что это вызвано тем, что значительная часть этих окон уже существовала на момент первичного передела (1986–1988).

Наилучшее соответствие показала модель линейной регрессии $S = -12.878n_{Bs} + 1034.397$, где S — общая удельная площадь окон высотного класса < 10 м (м² га⁻¹); n_{Bs} — количество деревьев (шт. га⁻¹) *Betula* spp. ($p = 0.00182$). Значение коэффициента детерминации (R^2) составляет 0.603. Однако мы предполагаем, что данная зависимость отражает лишь особенности пространственной структуры пробной площади и не имеет биологической интерпретации.

Полученные путем анализа результатов аэрофотосъемки площади окон составляют в среднем 97% от значений, полученных при наземной съемке, но с существенным разбросом (от 45 до 169%). Значительные отклонения в меньшую сторону являются, на наш взгляд, результатом исключения при анализе участков с высотой полога 15–20 м, в то время как отклонения в большую сторону — результатом неправильного определения границ окна при наземной съемке.

Минимальный размер окон может значительно варьировать в зависимости от характеристик древостоя. В обзоре (McCarthy, 2001) средний размер окон в широколиственных лесах умеренного пояса оценивается в пределах 28–239 м². В работе

(Комаров, 2021) минимальный размер окна выбран равным 20 м² как соответствующий средней площади проекций крон *T. cordata* и *P. abies* в условиях Подмосковья. Таким образом, выбранная нами оценка минимальной площади окна хорошо согласуется с оценками, выбранными другими исследователями. Средняя площадь окон, выделенных нами с помощью дистанционных методов, составляет около 106 м².

Возможным источником погрешности в оценке площадей окон является исключение полигонов из анализа на основании одной только их площади. Вероятно, для получения более точных результатов следует учитывать также форму полигона. Для этого можно использовать индекс сложности формы окна (GSCI), определяемый как отношение периметра окна к периметру круглого окна той же площади (Koukoulas, Blackburn, 2004). Таким образом, полигоны с меньшими значениями данного индекса (т.е. имеющие близкую к кругу форму) с высокой вероятностью являются окнами, в то время как полигоны с более высоким значением GSCI, даже если их площадь превышает выбранное нами пороговое значение в 25 м², скорее всего, соответствуют межкрупным пространствам. Также применяются и другие критерии сложности формы окна, основанные на его фрактальной размерности (Getzin *et al.*, 2012).

К сожалению, наличие всего одной пробной площади для исследований накладывает определенные ограничения на сделанные выводы, однако в данном случае ключевым является сочетание двух факторов: уникальности объекта исследования (старовозрастной малонарушенный полидоминантный многоярусный широколиственный лес) и количества собранных данных (два перечета древостоя за 30-летний период, картографирование местоположения деревьев, серия разносезонных ортофотопланов). Найти опубликованные данные или провести аналогичные наблюдения на других объектах, удовлетворяющих обоим условиям, и провести сравнение с ними в данный момент не представляется возможным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основываясь на полученных результатах, мы можем заключить, что в сложном многоярусном древостое детектирование окон возможно на основе моделей высот, но для выделения недавно возникших разрывов в пологе необходим анализ серии разновременных моделей и ортофотопланов, так как степень зарастания окна не является корректным показателем его возраста и, соответственно, может вводить в заблуждение относительно истинной оконной динамики.

Кроме того, мы обнаружили, что понятие границ окна в контексте аэрофотосъемки является

более размытым, чем при наземной съемке, что затрудняет сопоставление размеров окон, выделенных с помощью разных методов. Также мы пришли к выводу, что окна с высотой древостоя 15–20 м в исследованном нами древостое продуктивнее рассматривать как часть полога и что для получения наилучших результатов следует проводить аэрофотосъемку в период полного распускания листьев.

Сравнение разносезонных ортофотопланов позволило нам выявить сложные явления оконной динамики на постоянной пробной площади: обнажающие второй ярус вывалы и зарастающие *C. avellana* окна. Применение данного подхода к другим древостоям позволит уточнить наши представления об оконной динамике в лесных экосистемах разных типов, обеспечивая сопоставимость результатов исследований за счет стандартизации методов. Количественный учет оконной динамики позволит улучшить текущую оценку и прогноз реализации лесами экосистемных функций, включая поддержание биологического разнообразия и депонирование углерода, что важно для планирования охраны (для защитных и резервных лесов) или устойчивого и неистощительного лесопользования (в случае эксплуатационных лесов).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность коллегам, оказавшим помощь в сборе и обработке экспериментальных данных: к.б.н. Н.В. Ивановой, к.б.н. П.В. Фроловой, к.г.н. С.С. Быховцу, Е.С. Дину.

Работа Портнова А.М. выполнена в рамках темы государственного задания ФИЦ ПНЦБИ РАН (регистрационный № 122111000095-8).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бобровский М.В., Ханина Л.Г. Заповедник “Калужские засеки” // Оценка и сохранение биоразнообразия лесного покрова в заповедниках Европейской России / Под ред. Л.Б. Заугольной. М.: Научный мир, 2000. С. 104–124.
- Бобровский М.В. Козельские засеки (эколого-исторический очерк). Калуга: Изд-во Н. Бочкаревой, 2002. 92 с.
- Комаров А.В., Ершов Д.В., Тихонова Е.В. Информативность спектральных и морфометрических признаков оконной структуры полого древостоя на основе спутниковых данных // Лесоведение. 2021. № 3. С. 227–239.
<https://doi.org/10.31857/S0024114821030074>

- Коротков В.Н. Новая парадигма в лесной экологии // Биологические науки. 1991. № 8. С. 7–20.
- Портнов А.М., Быховец С.С., Дин Е.С., Иванова Н.В., Фролов П.В., Шанин В.Н., Шапков М.П. Количественная оценка размеров окон в пологе старовозрастного широколиственного леса наземными и дистанционными методами // Материалы Седьмой Национальной научной конференции с международным участием “Математическое моделирование в экологии”. Пушино: ИФХиБПП РАН – ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2021. С. 99–102.
- Смирнова О.В. Популяционная организация биоценологического покрова лесных ландшафтов // Успехи современной биологии. 1998. Т. 118. № 2. С. 148–165.
- Широков А.И. Использование метода парцеллярного анализа для оценки структурного биоразнообразия лесных сообществ // Лесоведение. 2005. № 1. С. 19–27.
- Barton I., Király G., Czimmer K., Hollaus M., Pfeifer N. Treefall gap mapping using Sentinel-2 images // Forests. 2017. Vol. 8. No 11. ID426. <https://doi.org/10.3390/f8110426>
- Bastin J.F., Berrahmouni N., Grainger A., Maniatis D., Mollicone D., Moore R., Patriarca C., Picard N., Sparrow B., Abraham E.M., Aloui K., Atesoglu A., Attore F., Bassüllü Ç., Bey A., Garzuglia M., García-Montoro L.G., Groot N., Guerin G., Laestadius L., Lowe A.J., Mamane B., Marchi G., Patterson P., Rezende M., Ricci S., Salcedo I., Diaz A.S.-P., Stolle F., Surappaeva V., Castro R. The extent of forest in dryland biomes // Science. 2017. Vol. 356. No 6338. P. 635–638. <https://doi.org/10.1126/science.aam6527>
- Branson S., Wegner J.D., Hall D., Lang N., Schindler K., Perona P. From Google Maps to a fine-grained catalog of street trees // ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing. 2018. Vol. 135. P. 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.isprsjprs.2017.11.008>
- Chen Q., Gao T., Zhu J., Wu F., Li X., Lu D., Yu F. Individual tree segmentation and tree height estimation using leaf-off and leaf-on UAV–LiDAR data in dense deciduous forests // Remote Sensing. 2022. Vol. 14. No 12. ID2787. <https://doi.org/10.3390/rs14122787>
- Condit R. Tropical Forest Census Plots: Methods and Results from Barro Colorado Island, Panama and a Comparison with Other Plots. Berlin: Springer, 1998. 211 p.
- Crowther T.W., Glick H.B., Covey K.R., Bettigole C., Maynard D.S., Thomas S.M., Smith J.R., Hintler G., Duguid M.C., Amatulli G., Tuanmu M.N., Jetz W., Salas C., Stam C., Piotta D., Tavani R., Green S., Bruce G., Williams S.J., Wiser S.K., Huber M.O., Hengeveld G.M., Nabuurs G.J., Tikhonova E., Borchardt P., Li C.F., Powrie L.W., Fischer M., Hemp A., Homeier J., Cho P., Vibrans A.C., Umunay P.M., Piao S.L., Rowe C.W., Ashton M.S., Crane P.R., Bradford M.A. Mapping tree density at a global scale // Nature. 2015. Vol. 525. P. 201–205. <https://doi.org/10.1038/nature14967>
- Dandois J.P., Ellis E.C. High spatial resolution three-dimensional mapping of vegetation spectral dynamics using computer vision // Remote Sensing of Environment. 2013. Vol. 136. P. 259–276. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2013.04.005>
- Feldmann E., Drößler L., Hauck M., Kucbel S., Pichler V., Leuschner C. Canopy gap dynamics and tree understory release in a virgin beech forest, Slovakian Carpathians // Forest Ecology and Management. 2018. Vol. 415–416. P. 38–6. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.02.022>
- Fox T.J., Knutson M.G., Hines R.K. Mapping forest canopy gaps using air-photo interpretation and ground surveys // Wildlife Society Bulletin. 2000. Vol. 28. No 4. P. 882–889. <https://doi.org/10.2307/3783843>
- Gardner T.A., Barlow J., Araujo I.S., Avila-Pires T.C., Bonaldo A.B., Costa J.E., Esposito M.C., Ferreira L.V., Hawes J., Hernandez M.I.M., Hoogmoed M.S., Leite R.N., Lo-Man-Hung N.F., Malcolm J.R., Martins M.B., Mestre L.A.M., Miranda-Santos R., Overal W.L., Parry L., Peters S.L., Ribeiro M.A., da Silva M.N.F., Motta C.D.S., Peres C.A. The cost-effectiveness of biodiversity surveys in tropical forests // Ecology Letters. 2008. Vol. 11. No 2. P. 139–150. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01133.x>
- Getzin S., Wiegand K., Schöning I. Assessing biodiversity in forests using very high-resolution images and unmanned aerial vehicles // Methods in Ecology and Evolution. 2012. Vol. 3. No 2. P. 397–404. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00158.x>
- Hansen M.C., Potapov P.V., Moore R., Hancher M., Turubanova S.A., Tyukavina A., Thau D., Stehman S.V., Goetz S.J., Loveland T.R., Kommareddy A., Egorov A., Chini L., Justice C.O., Townshend J.R.G. High-resolution global maps of 21st-century forest cover change // Science. 2013. Vol. 342. No 6160. P. 850–853. <https://doi.org/10.1126/science.1244693>
- Hobi M.L., Ginzler C., Commarmot B., Bugmann H. Gap pattern of the largest primeval beech forest of Europe revealed by remote sensing // Ecosphere. 2015. Vol. 6. No 5. P. 1–15. <https://doi.org/10.1890/ES14-00390.1>
- Jonckheere I., Nackaerts K., Muys B., Coppin P. Assessment of automatic gap fraction estimation of forests from digital hemispherical photography // Agricultural and Forest Meteorology. 2005. Vol. 132. No 1–2. P. 96–114. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2005.06.003>
- Koh L.P., Wich S.A. Dawn of drone ecology: low-cost autonomous aerial vehicles for conservation // Tropical Conservation Science. 2012. Vol. 5. No 2. P. 121–132. <https://doi.org/10.1177/194008291200500202>
- Koukoulas S., Blackburn G.A. Quantifying the spatial properties of forest canopy gaps using LiDAR imagery

- and GIS // *International Journal of Remote Sensing*. 2004. Vol. 25. No. 15. P. 3049–3072.
<https://doi.org/10.1080/01431160310001657786>
- Li W., Fu H., Yu L., Cracknell A. Deep learning based oil palm tree detection and counting for high-resolution remote sensing images // *Remote Sensing*. 2017. Vol. 9. No 1. ID22.
<https://doi.org/10.3390/rs9010022>
- Loarie S.R., Joppa L.N., Pimm S.L. Satellites miss environmental priorities // *Trends in Ecology & Evolution*. 2007. Vol. 22. No 12. P. 630–632.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.08.018>
- Lukina N.V., Geraskina A.P., Gornov A.V., Shevchenko N.E., Kuprin A.V., Chernov T.I., Chumachenko S.I., Shanin V.N., Kuznetsova A.I., Tebenkova D.N., Gornova M.V. Biodiversity and climate-regulating functions of forests: current issues and research prospects // *Forest Science Issues*. 2021. Vol. 4. No 1. P. 1–60.
<https://doi.org/10.31509/2658-607x-202141k-60>
- McCarthy J. Gap dynamics of forest trees: a review with particular attention to boreal forest // *Environmental Reviews*. 2001. Vol. 9. No 1. P. 1–59.
<https://doi.org/10.1139/a00-012>
- Mohan M., Silva C.A., Klauber G., Jat P., Catts G., Cardil A., Hudak A.T., Dia M. Individual tree detection from Unmanned Aerial Vehicle (UAV) derived canopy height model in an open canopy mixed conifer forest // *Forests*. 2017. Vol. 8. No 9. ID340.
<https://doi.org/10.3390/f8090340>
- Nijland W., Coops N.C., Macdonald E.S., Nielsen S.E., Bajer C.W., Stadt J.J. Comparing patterns in forest stand structure following variable harvests using airborne laser scanning data // *Forest Ecology and Management*. 2015. Vol. 354. P. 272–280.
<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.06.005>
- Otero V., Van De Kerchove R., Satyanarayana B., Martínez-Espinosa C., Fisol M.A.B., Ibrahim M.R.B., Sulong I., Mohd-Lokman H., Lucas R., Dahdouh-Guebas F. Managing mangrove forests from the sky: forest inventory using field data and unmanned aerial vehicle (UAV) imagery in the Matang Mangrove Forest Reserve, peninsular Malaysia // *Forest Ecology and Management*. 2018. Vol. 411. P. 35–45.
<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.12.049>
- Pajares G. Overview and current status of remote sensing applications based on unmanned aerial vehicles (UAVs) // *Photogrammetric Engineering and Remote Sensing*. 2015. Vol. 81. No 4. P. 281–330.
<https://doi.org/10.14358/PERS.81.4.281>
- Paneque-Gálvez J., McCall M., Napoletano B., Wich S., Koh L. Small drones for community-based forest monitoring: an assessment of their feasibility and potential in tropical areas // *Forests*. 2014. Vol. 5. No 6. P. 1481–1507.
<https://doi.org/10.3390/f5061481>
- Puliti S., Orka H.O., Gobakken T., Naesset E. Inventory of small forest areas using an Unmanned Aerial System // *Remote Sensing*. 2015. Vol. 7. No 8. P. 9632–9654.
<https://doi.org/10.3390/rs70809632>
- Rango A., Laliberte A., Herrick J.E., Winters C., Havstad K., Steele C., Browning D. Unmanned aerial vehicle-based remote sensing for rangeland assessment, monitoring, and management // *Journal of Applied Remote Sensing*. 2009. Vol. 3. No 1. ID033542.
<https://doi.org/10.1117/1.3216822>
- Ross C.W., Loudermilk E.L., Skowronski N., Pokswinski S., Hiers J.K., O'Brien J. LiDAR voxel-size optimization for canopy gap estimation // *Remote Sensing*. 2022. Vol. 14. No 5. ID1054.
<https://doi.org/10.3390/rs14051054>
- Saatchi S.S., Harris N.L., Brown S., Lefsky M., Mitchard E.T., Salas W., Zutta B.R., Buermann W., Lewis S.L., Hagen S., Petrova S., White L., Silman M., Morel A. Benchmark map of forest carbon stocks in tropical regions across three continents // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011. Vol. 108. No 24. P. 9899–9904.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1019576108>
- Shashkov M.P., Bobrovsky M.V., Shanin V.N., Khanina L.G., Grabarnik P. Ya., Stamenov M.N., Ivanova N.V. Data on 30-year stand dynamics in an old-growth broad-leaved forest in the Kaluzhskie Zaseki State Nature Reserve, Russia // *Nature Conservation Research*. 2022. Vol. 7 (Suppl. 1). P. 24–37.
<https://doi.org/10.24189/ncr.2022.013>
- Simard M., Pinto N., Fisher J.B., Baccini A. Mapping forest canopy height globally with spaceborne lidar // *Journal of Geophysical Research*. 2011. Vol. 116. No G4. ID G04021.
<https://doi.org/10.1029/2011JG001708>
- Smirnova O.V., Bobrovsky M.V., Khanina L.G., Braslavskaya T. Yu., Starodubtseva E.A., Evstigneev O.I., Korotkov V.N., Smirnov V.E., Ivanova N.V. Nemoral Forests // O.V. Smirnova, M.V. Bobrovsky, L.G. Khanina (Eds.): *European Russian forests: Their current state and features of their history. Plant and Vegetation* 15. Dordrecht: Springer, 2017. P. 333–476.
https://doi.org/10.1007/978-94-024-1172-0_5
- Sturm J., Santos M.J., Schmid B., Damm A. Satellite data reveal differential responses of Swiss forests to unprecedented 2018 drought // *Global Change Biology*. 2022. Vol. 28. No 9. P. 2956–2978.
<https://doi.org/10.1111/gcb.16136>
- Sylvain J.-D., Drolet G., Brown N. Mapping dead forest cover using a deep convolutional neural network and digital aerial photography // *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*. 2019. Vol. 156. P. 14–26.
<https://doi.org/10.1016/j.isprsjprs.2019.07.010>
- The mosaic-cycle concept of ecosystem / ed. by H. Remmert. Berlin, Heidelberg, NewYork: Springer-Verlag, 1991. 168 p.
- Tyrrell L.E., Crow T.R. Structural characteristics of old-growth hemlock-hardwood forests in relation to age //

- Ecology. 1994. Vol. 75. No 2. P. 370–386.
<https://doi.org/10.2307/1939541>
- Vepakomma U. Spatial contiguity and continuity of canopy gaps in mixed wood boreal forests: Persistence, expansion, shrinkage and displacement // *Journal of Ecology*. 2012. Vol. 100. No 5. 1257–1268.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2012.01996.x>
- Veselov V.M., Pribylskaya I.R., Mirzeabasov O.A. World Data Center (RIHMI-WDC), Roshydromet. 2021.
<http://aisori-m.meteo.ru/waisori>
- Vierling K.T., Vierling L.A., Gould W.A., Martinuzzi S., Clawges R.M. LiDAR: shedding new light on habitat characterization and modeling // *Frontiers in Ecology and the Environment*. 2008. Vol. 6. No 2. P. 90–98.
<https://doi.org/10.1890/070001>
- Wang Z., Waser L.T., Ginzler C. A novel method to assess short-term forest cover changes based on digital surface models from image-based point clouds // *Forestry: An International Journal of Forest Research*. 2015. Vol. 88. No 4. P. 429–440.
<https://doi.org/10.1093/forestry/cpv012>
- Watt A.S. Pattern and process in the plant community // *Journal of Ecology*. 1947. Vol. 35. No 1–2. P. 1–22.
- Whitehead K., Hugenholtz C.H. Remote sensing of the environment with small unmanned aircraft systems (UASs), part 1: a review of progress and challenges // *Journal of Unmanned Vehicle Systems*. 2014. Vol. 2. No 3. P. 69–85.
<https://doi.org/10.1139/juvs-2014-0006>
- Whitehead K., Hugenholtz C.H., Myshak S., Brown O., Le-Clair A., Tamminga A., Barchyn T.E., Moorman B., Eaton B. Remote sensing of the environment with small unmanned aircraft systems (UASs), part 2: scientific and commercial applications // *Journal of Unmanned Vehicle Systems*. 2014. Vol. 2. No 3. P. 86–102.
<https://doi.org/10.1139/juvs-2014-0007>
- Wulder M.A., Hall R.J., Coops N.C., Franklin S.E. High spatial resolution remotely sensed data for ecosystem characterization // *BioScience*. 2004. Vol. 54. No 6. P. 511–521.
[https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2004\)054\[0511:HSRRSD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0511:HSRRSD]2.0.CO;2)
- Zhang J., Huang S., Hogg E.H., Lieffers V., Qin Y., He F. Estimating spatial variation in Alberta forest biomass from a combination of forest inventory and remote sensing data // *Biogeosciences*. 2014. Vol. 11. No 10. P. 2793–2808.
<https://doi.org/10.5194/bg-11-2793-2014>
- Zhang J., Nielsen S.E., Mao L.F., Chen S.B., Svenning J.-C. Regional and historical factors supplement current climate in shaping global forest canopy height // *Journal of Ecology*. 2016. Vol. 104. No 2. P. 469–478.
<https://doi.org/10.1111/1365-2745.12510>

Comprehensive analysis of gap formation in the canopy of an old-growth broadleaved forest

A. M. Portnov^{1, #}, M. P. Shashkov², V. M. Shanin¹

¹*Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science of RAS – separate subdivision PSCBR RAS, Institutskaya, 2, Pushchino, 142290 Russia*

²*Karaganda Buketov University, Universitetskaya, 28, Karaganda, 100024 Kazakhstan*

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

We performed a quantitative and qualitative assessment of the dynamics of gap formation in the canopy of intact old-growth polydominant broadleaved forest in a permanent sample area in the Kaluga Zaseki Nature Reserve. Digital elevation models were obtained from aerial survey data of the forest in 2018 and 2021, from which gap diagrams of several elevation classes were constructed. The resulting schematics were expertly analyzed using orthophotomosaic survey data and gap areas were estimated. We conducted a sample ground survey of gaps and regression analysis of the relationship between relative gap area and stand species composition from the primary enumeration data. It was shown that the phenophase at the time of the survey can significantly change the estimate of gap areas, and the height of the stand in the gap cannot serve as a reliable indicator of its age. It was also found that aerial photography reveals a more complex gap structure than ground-based surveys.

Keywords: windthrow gaps, gap dynamics, Kaluga Zaseki Nature Reserve, orthophotomosaic, remote sensing methods, aerial photography, digital elevation model

СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ, ФИТОСТЕРИНОВ И СУММАРНОЕ СОДЕРЖАНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ СЕМЯН *MORUS L.*

© 2024 г. Ф. И. Исламова*, Г. К. Раджабов*, @, С. В. Горяинов**, Ф. Хажжар**, А. М. Алиев*

*Горный ботанический сад, Дагестанский федеральный исследовательский центр РАН,
ул. М. Ярагского, 75, г. Махачкала, Республика Дагестан, 367000 Россия

**ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва, 117198 Россия

@E-mail: chemfarm@mail.ru

Поступила в редакцию 17.10.2022 г.

После доработки 28.07.2023 г.

Принята к публикации 11.08.2023 г.

В настоящей работе впервые представлены результаты изучения суммарного содержания антиоксидантов в семенах *Morus L.* А также изучили состав жирных и стериновых кислот семян плодов шелковицы *Morus L.*: полиморфного вида *Morus alba* (белоплодная, розовоплодная, черноплодная) и *Morus nigra* (сорт Хартут). В результате исследований идентифицировано 12 жирных кислот, основными из которых были линолевая, пальмитиновая олеиновая и стеариновая кислоты. Преобладающей жирной кислотой во всех образцах являлась линолевая, пределы которой варьировали 67.5–79.0%. Стеринов было обнаружено 15, при этом на долю β-Ситостерина приходится около 90%. Определение суммарного содержания антиоксидантов семян *M. alba* (белоплодная, розовоплодная, черноплодная формы) и *M. nigra* (сорт Хартут) выявило накопление антиоксидантов во всех образцах. Наибольшее суммарное содержание антиоксидантов наблюдалось у *M. nigra* (4.40 мг/г) и белоплодной формы *M. alba* (5.56 мг/г)

Ключевые слова: шелковица, *Morus alba*, *Morus nigra* (сорт Хартут), антиоксиданты, жирные кислоты, фитостерины, линолевая кислота

DOI: 10.31857/S1026347024010144, **EDN:** LKJETP

В последние годы во многих странах мира ведется поиск дешевых и эффективных биологически активных веществ, источниками которых чаще всего становятся растительные объекты. Существует факт положительной связи между потреблением растительной пищи и снижением смертности от болезней (Cox *et al.*, 2000; Prior, Cao, 2000; Wargovich, 2000; Huang *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2005; Del Rio *et al.*, 2010; Rahal *et al.*, 2012; Upadhayay *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2021) из-за наличия в них биологически активных веществ и антиоксидантов (Skrovankova *et al.*, 2015). Антиоксиданты растительных объектов обладают способностью блокировать оксидантный стресс. Они защищают клеточные мембраны, ДНК от разрушения, предотвращают начало хронических заболеваний (Garcia-Closas *et al.*, 1999; Dillard, German, 2000; Gurib-Fakim, 2006;).

Одним из привлекательных растительных объектов является плодово-ягодная культура шелковица *Morus L.* Шелковица — древесное растение, обладающее биологическим и химическим потенциалом, имеет также огромную экономическую ценность и важное хозяйственное значение. К роду

Morus относятся 16 видов, более часто встречаются *Morus alba*, *Morus nigra*, *Morus rubra*. Стоит отметить, что вид *M. alba* обладает свойством полиморфизма (Bajrai *et al.*, 2015).

Литературные данные показывают, что *Morus* обладает антиоксидантной, нейропротекторной, антиатеросклерозной, иммуномодулирующей, противоопухолевой активностью (Guil-Guerrero, 2007; Kim, Chung, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2019).

Активно исследуются все части растения (плоды, листья, кора, корни, древесина), однако литературные данные отсутствуют по антиоксидантным свойствам семян шелковицы. Семена шелковицы являются ценным вторичным сырьем, содержащим полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) (Yang *et al.*, 2011; Van Hoed *et al.*, 2011). Масла семян благодаря своему составу являются биологически ценными растительными жирами (Van Hoed *et al.*, 2009; Pieszka *et al.*, 2015). Они также содержат необходимые для организма фитостерины, способные снизить уровень холестерина в крови и предотвратить сердечно-сосудистые заболевания, что

придает сырью диетическую, и терапевтическую ценность (Wang *et al.*, 2002; Vivancos, Moreno, 2005).

Таким образом, литературные данные демонстрируют высокую степень изученности биологических свойств шелковицы. Однако практически отсутствует материал по изучению суммарного содержания антиоксидантов в семенах в зависимости от вида и формы *Morus*, что может иметь как фундаментальную биологическую, так и прикладную значимость.

Целью данной работы является изучение накопления жирных кислот, стероидов, а также определение суммарного содержания антиоксидантов семян плодов *M. alba* и *M. nigra*, произрастающих в идентичных экологических условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили семена плодов и экстрагированные масла из семян полиморфного вида шелковицы *M. alba* (белоплодная, черноплодная, розовоплодная формы) и *M. nigra* (сорт Хартут), произрастающих в Республике Дагестан.

Сбор образцов проводили в период массового созревания плодов во второй декаде июня в частном питомнике (ООО “Низам”), расположенном в пригороде г. Махачкалы (пос. Ленинкент, Республика Дагестан). Деревья одного возраста (27 лет), отдельно стоящие. Почвы на участке каштановые, суглинистые, с содержанием гумуса 2–3%. Участок поливной.

Метод получения масла

Извлечение масла из семян исследуемых образцов проводили методом экстракции в аппарате Сокслета, используя в качестве растворителя гексан. Содержание масла определяли в массовых процентах (масс. %) от исходной массы семян.

Метод определения суммарного содержания антиоксидантов (ССА)

Определение суммарного содержания антиоксидантов в водно-спиртовых вытяжках (70%) из семян плодов *M. alba* и *M. nigra*, проводили амперометрическим методом на приборе «Цвет Яуза 01-АА», основанном на измерении электрического тока в электрохимической ячейке, возникающего при подаче на электрод определенного потенциала. При построении градуировочного графика, с целью исключения случайных результатов были приготовлены растворы галловой кислоты (фирма Sigma-Aldrich, чистота > 98.5%) с массовой концентрацией 0.2; 0.4; 2.0; 4.0 мг/л и проводились 3 последовательных измерения. В качестве элюента, использовали ортофосфорную кислоту (производитель “Компонент-реактив”, РФ) с молярной

долей 0.0022 моль/дм³. С помощью градуировки сравнивали сигналы исследуемого экстракта с сигналами образца сравнения — галловой кислоты. Значения СКО (относительное среднее квадратичное отклонение) по методике должны составить не более 5%. В нашем случае они не превышали 1%. Анализ проводили трижды, за результат принимали средние значения. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием пакета электронных таблиц Microsoft Excel и лицензионного пакета программ Statistika 5.5. Суммарное содержание антиоксидантов в исследуемых образцах семян *Morus* выражали в мг/г (т.е. мг-ССА/г-семян) (Яшин, Яшин, 2004).

Метод исследования жирнокислотного состава

Исследование жирнокислотного состава масел семян *Morus* проводили методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием (ГХ-ПИД). Режим работы хроматографа Agilent 7890A: капиллярная колонка VF-23MS (длина 30 м, внутренний диаметр 0.32 мм, толщина фазы 0.25 мкм), газ-носитель — гелий, скорость газа-носителя — 1.5 мл/мин, температура инжектора — 280°C, начальная температура печи хроматографа — 50°C, затем изотерма в течение 2 мин, после чего нагрев со скоростью 10°C/мин до 180°C, выдержка 5 мин, затем до 240°C со скоростью 5°C/мин. Общее время анализа — 32 мин. Пробу инжестировали в режиме деления потока (1:10). Идентификацию жирных кислот проводили путем сравнения времен удерживания пиков на хроматограммах испытуемых образцов с временами удерживания пиков на хроматограмме стандартного образца смеси 37 метиловых эфиров жирных кислот (Supelco® 37 component FAME mix). Каждый образец анализировали трижды, за результат принимали средние значения.

Пробоподготовка: метиловые эфиры жирных кислот получали переэтерификацией глицеридов. Навеску образца массой около 10.0 мг помещали в 7.0-мл стеклянную вials с закручивающейся крышкой, затем добавляли 1.0 мл метанола и 100.0 мкл ацетилхлорида. Вials закрывали и помещали в лабораторный нагреватель на 60 мин при 80°C. После охлаждения реакционной смеси в вials добавляли 3.0 мл бидистиллированной воды, а затем 1.0 мл н-гексана и интенсивно встряхивали. 1.0 мкл верхнего слоя н-гексана инжестировали в газовый хроматограф.

Метод исследования неомыляемой фракции

Исследование состава неомыляемой фракции масел семян проводили методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС). Режим работы хроматографа Agilent 6890N: капиллярная колонка

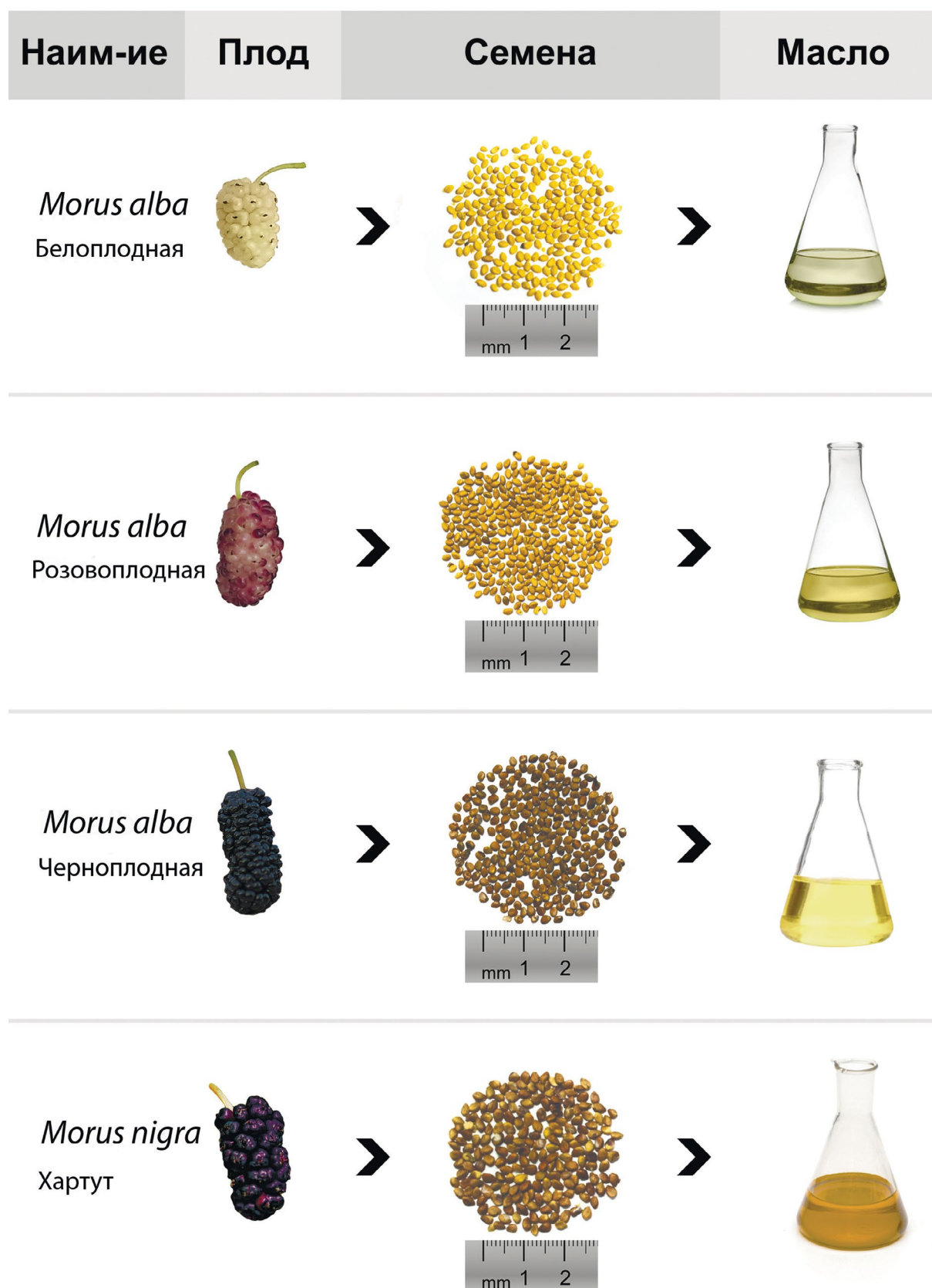


Рис. 1. Этапы извлечения масла.

VF-5MS (длина 30 м, внутренний диаметр 0.25 мм, толщина фазы 0.25 мкм), газ-носитель — гелий, скорость газа-носителя — 1.5 мл/мин, температура инжектора — 280°C, начальная температура печи хроматографа — 60°C, затем изотерма в течение 3 мин, после чего нагрев со скоростью 10°C/мин до 290°C, выдержка при 290°C в течение 20 мин. Общее время анализа — 46 мин. Пробу инжектировали в режиме деления потока (1:10). Режим регистрации масс-спектров на магнитно-секторном масс-спектрометре JMS GCmate II (JEOL, Япония): энергия ионизации — 70 эВ, температура источника — 270°C, сканирование в диапазоне 40–600 Да со скоростью 2 скан/с.

Для идентификации использовали стандартные образцы индивидуальных соединений и масс-спектральную базу данных NIST'14; в случае отсутствия в ней масс-спектров обнаруженных компонентов установление структуры проводилось на основе характеристических процессов фрагментации и данных о хроматографических свойствах изучаемых соединений. Для расчета индексов удерживания проводили анализ смеси нормальных углеводородов (C6–C35) в выбранных хроматографических условиях. При определении количественного содержания стеринных и тритерпеновых спиртов в пересчете на внутренний стандарт (холестанол) их коэффициенты ионизации приравнивались.

Пробоподготовка: для выделения неомыляемой фракции 100.0 мг образца помещали в стеклянную вials объемом 7.0 мл, добавляли 1.0 мл 2N метанольного раствора КОН и 10.0 мкл раствора внутреннего стандарта (холестанол, 10.0 мг/мл). Затем образцы выдерживали при температуре 80°C в течение часа и после охлаждения реакционной массы добавляли 3 мл воды бидистиллированной. Неомыляемую фракцию экстрагировали тремя порциями по 1.0 мл диэтилового эфира, экстракты объединяли, пропускали через патрон с натрия сульфатом прокаленным, отдували досуха растворитель

под током азота и силилировали перед проведением анализа. Для этого к сухому остатку добавляли 300.0 мкл смеси BSTFA: ацетонитрил (1:2) и выдерживали в течение 30 минут при 80°C, затем 1.0 мкл раствора инжектировали в прибор ГХ–МС.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты экстракции показали, что исследуемые образцы содержат масло в пределах 15.61–31.27 mass%. (табл. 1), при этом белоплодный образец *M. alba* более чем в 2 раза превосходил по данному показателю *M. nigra* (сорт Хартут). Полученные данные сопоставимы с работами других авторов (Gecgel et al., 2011; Rahman et al., 2014).

Изучение суммарного содержания антиоксидантов семян *M. alba* и *M. nigra* выявило накопление антиоксидантов во всех образцах (табл. 1). Особо отличились *M. alba* (белоплодная форма) — 5.56 мг/г и *M. Nigra* — 4.40 мг/г. Полученные данные демонстрируют изменчивость содержания антиоксидантов в зависимости от вида и жизненной формы объекта. Следует отметить, что по сравнению с семенами пряно-ароматических и эфиромасличных растений (Исламова и др., 2019) суммарное содержание антиоксидантов у семян *Morus* выше.

Учитывая идентичные экологические условия роста растений, можно предположить, что разное накопление масел и отличающиеся суммарные содержания антиоксидантов семян видов и разных форм *Morus* являются генетически закрепленной особенностью.

Жирно-кислотный состав семян полиморфного вида *M. alba* и *M. nigra* (сорт Хартут)

В результате изучения состава жирных кислот *M. alba*, и *M. nigra* идентифицировано 12 жирных кислот (табл. 2). В исследуемых образцах наибольшее количество приходилось на линолевую (C18:2), пальмитиновую (C16:0), олеиновую (C18:1) и стеариновую (C18:0) кислоты, которые вместе составляют приблизительно 90% от общего количества идентифицированных.

Линолевая — полиненасыщенная незаменимая жирная кислота, содержание в образцах варьировало в пределах 67.45–79.00%. Она физиологически необходима организму человека, способна предотвратить ишемический инсульт, ожирение, атеросклероз, хронические воспалительные и онкологические заболевания и ряд других острых заболеваний (Iso et al., 2002; Evstatieva et al., 2010). Обладает огромным биологическим потенциалом и антиоксидантным действием.

Пальмитиновая кислота (C16:0) (9.70–12.18%) — важный компонент мембранных, секреторных

Таблица 1. Суммарное содержание антиоксидантов и масла в образцах семян полиморфного вида *Morus alba* и *Morus nigra* (сорт Хартут)

Объект <i>Morus</i>		ССА, мг/г	Содержание масла, %
<i>Morus alba</i>	Белоплодная форма	5.56 ± 0.01	31.3 ± 0.5
	Черноплодная форма	3.03 ± 0.01	22.3 ± 0.4
	Розовоплодная форма	2.59 ± 0.00	27.4 ± 0.5
<i>Morus nigra</i> (сорт Хартут)		4.40 ± 0.01	15.6 ± 0.2

Таблица 2. Профили жирных кислот масла семян полиморфного вида *Morus alba* и *Morus nigra* (сорт Хартут), %

Жирная кислота	Формы <i>Morus alba</i>			<i>Morus nigra</i> (сорт Хартут)
	Белоплодная	Черноплодная	Розовоплодная	
Содержание, %				
Насыщенные жирные кислоты				
C12:0 Лауриновая	2.91 ± 0.02	1.73 ± 0.10	1.07 ± 0.12	2.41 ± 0.17
C14:0 Миристиновая	0.17 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.15 ± 0.03
C16:0 Пальмитиновая	9.67 ± 0.15	8.61 ± 0.11	8.14 ± 0.29	12.18 ± 0.18
C18:0 Стеариновая	4.13 ± 0.04	3.44 ± 0.12	3.89 ± 0.10	4.65 ± 0.30
C20:0 Арахидовая	2.00 ± 0.03	0.46 ± 0.06	0.53 ± 0.06	1.13 ± 0.15
C22:0 Бегеновая	0.11 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.13 ± 0.02
C24:0 Лигноцериновая	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Мононенасыщенные жирные кислоты				
C16:1 Пальмитолеиновая	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.38 ± 0.07
C18:1 Олеиновая	10.29 ± 0.24	5.63 ± 0.42	7.48 ± 0.37	9.17 ± 0.29
C18:1 Вакценовая	1.68 ± 0.06	0.75 ± 0.11	0.08 ± 0.01	0.91 ± 0.12
C20:1 Гондоиновая	1.42 ± 0.22	0.14 ± 0.04	0.13 ± 0.01	0.27 ± 0.07
Полиненасыщенные жирные кислоты				
C18:2 Линолевая	67.45 ± 0.72	79.32 ± 0.74	78.46 ± 0.90	68.54 ± 0.41

и транспортных липидов (Carta *et al.*, 2015). Олеиновая кислота (C18:1) (9.17–10.29%) устойчива к окислительному стрессу, играет активную роль во многих процессах организма (Carrillo *et al.*, 2012). Стеариновая кислота (C18:0) (4.13–4.65%) обладает протромботическим действием, стабилизирует уровень холестерина липопротеинов низкой плотности (Kelly *et al.*, 2001). В своих работах авторы (Guil-Guerrero, 2001; Sanchez-Salcedo *et al.*, 2016) сообщают, что жирные кислоты – линолевая, пальмитиновая, олеиновая и стеариновая – являлись основными в масле семян двух видов *M. alba* и *M. nigra*, как и в нашем исследовании. В суммарном содержании от общего количества необходимых жирных кислот образец масла *M. alba* (белоплодная) составил около 75%. Но стоит отметить, что в количественном отношении наблюдались внутривидовые отличия у *M. alba* между генотипами (белоплодная, розовоплодная, черноплодная). Также наблюдались и видовые отличия между *M. alba* и *M. nigra* в суммарном содержании в пользу *M. alba*.

Состав фитостерина масла семян полиморфного вида *M. alba* и *M. nigra* (сорт Хартут)

В результате изучения фитостеринового состава неомыляемой части липидов семян *M. alba* и *M. nigra* обнаружено 15 различных фитостерин (табл. 3). В исследуемых образцах масла компоненты

β-Ситостерина, (3β)-Lup-20(29)-ene-3,28-diol, кампестерина, стигмастерина, циклоартенола, ситостанола (в образце масла *M. nigra* отсутствует), 24-метиленциклоартанола, цитростадиенола, Δ⁷-Авенастерина, холестерина в сумме составляли около 95% от общего количества идентифицированных веществ. β-Ситостерин во всех образцах масла является преобладающим, что придает особую значимость маслу. Исследователи констатируют, что β-Ситостерин способен снижать уровень холестерина, обладает антиоксидантными свойствами, а также противораковым, антиатеросклерозным, противовоспалительным действием (Weng, Wang, 2000). Свойствам β-Ситостерина нейтрализовать свободные радикалы уделяется большое внимание в медицинских исследованиях, направленных на поиск методов профилактики различных болезней. Стоит отметить, что во всех образцах масла обнаружен холестерин. Известно, что холестерин рассматривается как нежелательный стерин для организма, особенно людям, страдающим сердечно-сосудистыми заболеваниями. Но его содержание в небольших количествах необходимо, так как является важным соединением в биосинтезе растительных стероидов и при метаболизме он производит сапонины (органические соединения растительного происхождения). Сапонины в свою очередь оказывают существенное влияние в устойчивости растений к болезням (Brown, Galea, 2010; Li *et al.*, 2022).

Таблица 3. Стериновый состав масла семян полиморфного вида *Morus alba* и *Morus nigra* (сорт Хартут)

Фитостерины	Формы <i>Morus alba</i>			<i>Morus nigra</i> (сорт Хартут)
	Белоплодная	Черноплодная	Розовоплодная	
	Содержание, мг/100 г			
Холестерин	29.1 ± 0.6	11.4 ± 1.1	6.3 ± 0.4	13.2 ± 1.0
Кампестерин	27.2 ± 0.3	32.7 ± 1.8	36.2 ± 0.8	15.3 ± 1.0
Стигмастерин	32.6 ± 1.9	27.1 ± 1.5	10.5 ± 0.6	11.6 ± 1.0
Клеростерин	3.1 ± 0.1	4.0 ± 0.2	4.7 ± 0.5	3.2 ± 0.4
β-Ситостерин	243.3 ± 7.8	382.1 ± 6.3	333.4 ± 2.7	243.9 ± 4.9
Ланостерин	12.9 ± 0.9	18.2 ± 0.9	15.1 ± 0.3	9.3 ± 0.7
Ситостанол	50.3 ± 2.0	63.9 ± 1.7	45.9 ± 1.0	0.0
Δ7-Авенастерин	7.1 ± 0.3	21.7 ± 0.8	9.9 ± 0.2	13.0 ± 0.9
Циклоартенол	35.5 ± 3.2	39.9 ± 2.3	33.3 ± 1.6	42.6 ± 1.4
(3β)-stigmasta-7,24(28)-dien-3-ol	8.4 ± 0.6	4.3 ± 0.4	1.9 ± 0.4	5.9 ± 0.7
γ-Ситостенон	6.3 ± 0.7	0.0	0.0	0.0
24-Метиленициклоартанол	30.6 ± 2.3	37.6 ± 1.4	37.2 ± 1.7	36.6 ± 1.0
Цитростадиенол	20.4 ± 1.8	51.3 ± 1.1	41.8 ± 2.0	39.1 ± 0.9
Unidentified compound (MM = 426 Da)	1.8 ± 0.2	2.7 ± 0.3	0.8 ± 0.1	2.4 ± 0.4
(3β)-Lup-20(29)-ene-3,28-diol	99.2 ± 3.3	20.9 ± 1.9	18.2 ± 1.1	11.6 ± 0.8
Всего	607.8 ± 26.3	717.8 ± 21.3	595.2 ± 13.5	476.2 ± 15.3

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Исследования показали, что качественный состав жирных кислот масла *Morus* был идентичен для всех образцов, но наблюдались незначительные отличия в количественном составе. Однако была выявлена межвидовая и внутривидовая изменчивость семян *Morus* по суммарному содержанию антиоксидантов, где высокие показатели продемонстрировал *M. alba* (белоплодная форма). Кроме того, все формы *Morus alba* (белоплодная, черноплодная и розовоплодная) отличались как высоким содержанием масла, так и суммарным содержанием фитостеринов. На основании полученных данных следует, что семена шелковицы – вторичное сырье, образующееся при переработке плодов шелковицы, – представляют собой дополнительный природный источник антиоксидантов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Публикация выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства РУДН (This paper has been supported by the RUDN University Strategic Academic Leadership Program).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

Исламова Ф.И., Мусаев А.М., Раджабов Г.К. Структура изменчивости некоторых пряно-ароматических растений по содержанию суммарных антиоксидантов в эколого-географическом эксперименте // Овоши России. 2019. № 3. С. 87–90. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-3-87-90>

Яшин А.Я., Яшин Я.И. Прибор для определения антиоксидантной активности растительных лекарственных экстрактов и напитков // МИС-РТ. 2004. № 34. С. 10–14.

Bajpai P.K., Warghat A.R., Yadav A., Kant A., Srivastava R.B., Stobdan T. High phenotypic variation in *Morus alba* L. along an altitudinal gradient in the Indian trans-Himalaya // J. Mt. Sci. 2015. V. 12. № 2. P. 446–455. <https://doi.org/10.1007/s11629-013-2875-2>

Brown A.J., Galea A.M. Cholesterol as an evolutionary response to living with oxygen // Evolution. 2010. V. 64. № 7. P. 2179–2183. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.01011.x>

Carrillo C., Cavia M., Alonso-Torre S.R. Efecto antitumoral del ácido oleico; mecanismos de acción: revisión científica // Nutr Hosp. 2012. V. 27. № 6. P. 1860–1865. <http://hdl.handle.net/10259.4/2522>

Carta G., Murru E., Lisai S., Sirigu A., Piras A., Colalu M., Banni S. Dietary triacylglycerols with palmitic acid in the sn-2 position modulate levels of

- N-acyl ethanolamides in rat tissues // PLoS One. 2015. V. 10. № 3. P. e0120424.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120424>
- Cox B.D., Whichelow M.J., Prevost A.T. Seasonal consumption of salad vegetables and fresh fruit in relation to the development of cardiovascular disease and cancer // Public Health Nutr. 2000. V. 3. № 1. P. 19–29.
<https://doi.org/10.1017/S1368980000000045>
- Del Rio D., Borges G., Crozier A. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects // Br.J. Nutr. 2010. V. 104. № 3. P. S67–S90.
<https://doi.org/10.1017/S0007114510003958>
- Dillard C.J., German J.B. Phytochemicals: nutraceuticals and human health // J. Sci. Food Agric. 2000. V. 80. № 12. P. 1744–1756.
[https://doi.org/10.1002/1097-0010\(20000915\)80:12<1744::AID-JS-FA725>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-0010(20000915)80:12<1744::AID-JS-FA725>3.0.CO;2-W)
- Evstatieva L., Todorova M., Antonova D., Staneva J. Chemical composition of the essential oils of *Rhodiola rosea* L. of three different origins // Pharmacogn. Mag. 2010. V. 6. № 24. P. 256.
<https://doi.org/10.4103/0973-1296.71782>
- Garcia-Closas R., Gonzalez C.A., Agudo A., Riboli E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain // Cancer Causes & Control. 1999. V. 10. № 1. P. 71–75.
<https://doi.org/10.1080/01635589809514734>
- Gecgel U., Velioglu S.D., Velioglu H.M. Investigating some physicochemical properties and fatty acid composition of native black mulberry (*Morus nigra* L.) seed oil // J. Am. Oil Chem. Soc. 2011. V. 88. № 8. P. 1179–1187.
<https://doi.org/10.1007/s11746-011-1771-6>
- Guil-Guerrero J.L. Stearidonic acid (18: 4n-3): Metabolism, nutritional importance, medical uses and natural sources // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2007. V. 109. № 12. P. 1226–1236.
<https://doi.org/10.1002/ejlt.200700207>
- Guil-Guerrero J.L., García Maroto F.F., Gimenez Gimenez A. Fatty acid profiles from forty-nine plant species that are potential new sources of γ -linolenic acid. // J. Am. Oil Chem. Soc. 2001. V. 78. № 7. P. 677–684.
<https://doi.org/10.1007/s11746-001-0325-9>
- Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow // Mol. Aspects Med. 2006. V. 27. № 1. P. 1–93.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.008>
- Hu J., Vinothkanna A., Wu M., Ekumah J.N., Akpabli-Tsigbe N.D.K., Ma Y. Tracking the dynamic changes of a flavor, phenolic profile, and antioxidant properties of *Lactiplantibacillus plantarum*- and *Saccharomyces cerevisiae*-fermented mulberry wine // Food Sci. Nutr. 2021. V. 9. № 11. P. 6294–6306.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.2590>
- Huang D., Ou B., Prior R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. № 6. P. 1841–1856.
<https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Iso H., Sato S., Umemura U., Kudo M., Koike K., Kitamura A., Imano H., Okamura T., Naito Y., Shimamoto T. Linoleic acid, other fatty acids, and the risk of stroke // Stroke. 2002. V. 33. № 8. P. 2086–2093.
<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000023890.25066.50>
- Kelly F.D., Sinclair A.J., Mann N.J., Turner A.H., Abedin L., Li D. A stearic acid-rich diet improves thrombogenic and atherogenic risk factor profiles in healthy males // Eur. J. Clin. Nutr. 2001. V. 55. № 2. P. 88–96.
<https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601122>
- Kim B.S., Kim H., Kang S.S. In vitro anti-bacterial and anti-inflammatory activities of lactic acid bacteria-bio-transformed mulberry (*Morus alba* Linnaeus) fruit extract against *Salmonella Typhimurium* // Food Control. 2019. V. 106. P. 106758.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106758>
- Kim H., Chung M.S. Antiviral activities of mulberry (*Morus alba*) juice and seed against influenza viruses // J. Evidence-Based Complementary Altern. Med. 2018. V. 2018. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1155/2018/2606583>
- Li X., Xin Y., Mo Y., Marozik P., He T., Guo H. The Bio-availability and Biological Activities of Phytosterols as Modulators of Cholesterol Metabolism // Molecules. 2022. V. 27. № 2. P. 523.
<https://doi.org/10.3390/molecules27020523>
- Pieszka M., Migdal W., Gąsior R., Rudzińska M., Beder-ska-Łojewska D., Pieszka M., Szczurek P. Native oils from apple, blackcurrant, raspberry, and strawberry seeds as a source of polyenoic fatty acids, tocopherols, and phytosterols: A health implication // Journal of Chemistry. 2015. V. 2015. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1155/2015/659541>
- Prior R.L., Cao G. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications // HortScience. 2000. V. 35. № 4. P. 588–592.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.35.4.588>
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. № 10. P. 4290–4302.
<https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Rahal A., Deb R., Latheef S.K., Tiwari R., Verma A.K., Kumar A., Dhama K. Immunomodulatory and therapeutic potentials of herbal, traditional/indigenous and ethnoveterinary medicines // Pak. J. Biol. Sci. 2012. V. 15. № 16. P. 754–774.
<https://doi.org/10.3923/pjbs.2012.754.774>
- Rahman M.M., Akther A., Moinuddin M., Yeasmin M.S., Rahman M.M., Rahman M.S., Ferdousi S.A., Sayeed M.A. Investigation some physicochemical properties, lipids, glycerides and fatty acid composition of mulberry (*Morus alba* L.) seed oil of three different regions of Bangladesh // Am.J. Appl. Chem. 2014. V. 2.

- P. 38–41.
<https://doi.org/10.11648/j.ajac.20140203.11>
- Sanchez-Salcedo E.M., Sendra E., Carbonell-Barrachina A.A., Martínez J.J., Hernandez F.* Fatty acids composition of Spanish black (*Morus nigra* L.) and white (*Morus alba* L.) mulberries // *Food Chemistry*. 2016. V. 190. P. 566–571.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.008>
- Skrovankova S., Sumczynski D., Mlcek J., Jurikova T., Sochor J.* Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 16. № 10. P. 24673–24706.
<https://doi.org/10.3390/ijms161024673>
- Upadhyay U.P.P.D.D., Chikitsa P., Sansthan V.V.E.G.A.* Clinical drug interactions: a holistic view // *Pak. J. Biol. Sci.* 2013. V. 16. № 16. P. 751–758.
<https://doi.org/10.3923/pjbs.2013.751.758>
- Van Hoed V., Barbouche I., De Clercq N., Dewettinck K., Slah M., Leber E., Verhe R.* Influence of filtering of cold pressed berry seed oils on their antioxidant profile and quality characteristics // *Food Chemistry*. 2011. V. 127. № 4. P. 1848–1855.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.134>
- Van Hoed V., De Clercq N., Echim C., Andjelkovic M., Leber E., Dewettinck K., Verhe R.* Berry seeds: a source of specialty oils with high content of bioactives and nutritional value // *J. Food Lipids*. 2009. V. 16. № 1. P. 33–49.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2009.01130.x>
- Vivancos M., Moreno J.J.* β -Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages // *Free Radic. Biol. Med.* 2005. V. 39. № 1. P. 91–97.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.025>
- Wang T., Hicks K.B., Moreau R.* Antioxidant activity of phytosterols, oryzanol, and other phytosterol conjugates // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2002. V. 79. № 12. P. 1201–1206.
<https://doi.org/10.1007/s11746-002-0628-x>
- Wargovich M.J.* Anticancer properties of fruits and vegetables // *HortScience*. 2000. V. 35. № (4). P. 573–575.
<https://doi.org/10.21273/hortsci.35.4.573>
- Weng X.C., Wang W.* Antioxidant activity of compounds isolated from *Salvia plebeia* // *Food Chemistry*. 2000. V. 71. № 4. P. 489–493.
[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00191-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00191-6)
- Yang B., Ahotupa M., Maatta P., Kallio H.* Composition and antioxidative activities of supercritical CO₂-extracted oils from seeds and soft parts of northern berries // *Food Res. Int.* 2011. V. 44. № 7. P. 2009–2017.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.025>
- Zhang H., Ma Z.F., Luo X., Li X.* Effects of mulberry fruit (*Morus alba* L.) consumption on health outcomes: A mini-review // *Antioxidants*. 2018. V. 7. № 5. P. 69.
<https://doi.org/10.3390/antiox7050069>

Composition of fatty acids, phytosterols and Total Content of Antioxidants of *Morus* L. seeds

F. I. Islamova¹, G. K. Radzhabov^{1, #}, S. V. Goriainov², F. Hajjar², A. M. Aliev¹

¹Mountain Botanical Garden, Dagestan Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, 75 M. Yaragsky, Makhachkala, 367000 Russia

²FSAEI RUDN (“Peoples’ Friendship University of Russia”), 6 Miklukho-Maclay, Moscow, 117198 Russia

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

This paper presents for the first time the results of studying the total content of antioxidants in the seeds of *Morus* L. The composition of fatty and steric acids of the seeds of mulberry fruits *Morus* L. was also studied: polymorphic species *Morus alba* (white-fruited, pink-fruited, black-fruited) and *Morus nigra* (Khartut variety). As a result of the studies, 12 fatty acids were identified. The main ones were linoleic acid, palmitic oleic acid, and stearic acid. The predominant fatty acid in all samples was linoleic, which varied from 67.5 to 79.0%. 15 sterols were found, among which β -Sitosterol accounts for about 90%. Determination of the total antioxidant content of *Morus alba* seeds (white-fruited, pink-fruited, black-fruited forms) and *Morus nigra* (Khartut variety) revealed the accumulation of antioxidants in all samples. The highest total content of antioxidants was observed in *Morus nigra* (4.40 mg/g) and the white-fruited form of *Morus alba* (5.56 mg/g).

Key words: mulberry, *Morus alba*, *Morus nigra* (Khartut variety), antioxidants, fatty acids, phytosterols, linoleic acid.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 599.745.3: 591.111.1

**ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭРИТРОЦИТОВ
У БЕЛОМОРСКИХ МОРСКИХ ЗАЙЦЕВ *ERIGNATHUS BARBATUS*
BARBATUS ERXLEBEN, 1777 (PHOCIDAE) РАЗЛИЧНОГО ВОЗРАСТА**

© 2024 г. И. А. Ерохина*, @

*Мурманский морской биологический институт РАН, ул. Владимирская, 17, Мурманск, 183010 Россия

@E-mail: irina.erohina58@mail.ru

Поступила в редакцию 04.04.2023 г.

После доработки 28.06.2023 г.

Принята к публикации 29.06.2023 г.

Проведено сравнительное исследование некоторых параметров эритроцитов морских зайцев различного возраста (3 года, 5 лет, 10 лет). Установлено, что с возрастом устойчивость эритроцитарных мембран к гемолизу повышается. В период полового созревания интенсивность гликолиза в эритроцитах морских зайцев повышается и затем снижается у взрослых животных. Показаны различия в содержании калия, кальция, магния в эритроцитах животных изученных возрастных групп.

Ключевые слова: морской заяц, *Erignathus barbatus*, кровь, эритроциты, метаболизм

DOI: 10.31857/S1026347024010154, **EDN:** LJVNTC

Морской заяц атлантического подвида (*Erignathus barbatus barbatus* Erxleben, 1777) является одним из наименее изученных морских млекопитающих Арктики, несмотря на его широкое распространение. Исследованиям этого вида уделяется меньше внимания, чем другим представителям ластоногих. Отдельные работы посвящены изучению распределения, численности, репродуктивной биологии и некоторым аспектам физиологии дыхания (Andersen *et al.*, 1999; Charrier *et al.*, 2013; Светочева и др., 2017; Charmain *et al.*, 2018; Светочев, Кавцевич, 2019). В литературе практически отсутствуют сведения о метаболических характеристиках крови этих животных. В последние годы появились данные о составе крови морских зайцев Белого моря (Минзюк и др., 2015; Erokhina, Kavtsevich, 2019), Аляски (Goertz *et al.*, 2019) и Шпицбергена (Tryland *et al.*, 2021) в связи с оценкой физиологического состояния животных. Развитие такого рода исследований обусловлено интересом к вопросу использования морских млекопитающих, наряду с другими гидробионтами, в качестве видов – индикаторов состояния морских экосистем. Многочисленные публикации (Fair, Becker, 2000; Johannessen, Miles, 2011; Рожнов, 2015; Goertz *et al.*, 2019) называют поиск чувствительных индикаторов экологического неблагополучия одним из центральных вопросов в мониторинге природных популяций животных. Неотъемлемой составляющей подобных работ является исследование крови как один из доступных

и эффективных методов прижизненной оценки состояния животных в естественной среде обитания. Полученные физиолого-биохимические параметры принимаются в качестве референтных и в дальнейшем используются в системе оценки уровня нагрузки на животных различных природных и антропогенных факторов.

Ранее нами были получены данные о биохимическом составе плазмы крови у морских зайцев, обитающих в Белом море (Erokhina, Kavtsevich, 2019). Цель данной работы – характеристика показателей метаболизма эритроцитов этих животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Кровь морских зайцев была получена во время экспедиций в Онежский залив Белого моря в июле 2014–2015 гг. у животных следующих возрастных групп: 3 года (молодые, $n = 4$), 5 лет (половозрелые, $n = 4$), 10 лет (взрослые, $n = 3$). С животными обращались в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (1986). Тюлени были пойманы на линии морского побережья вручную с помощью обручной сетки, без предварительной иммобилизации. Все животные были в адекватном состоянии здоровья (без внешних признаков болезни). Возраст тюленей оценивался по размеру тела и состоянию когтей на передних лапах. Образцы крови брали из

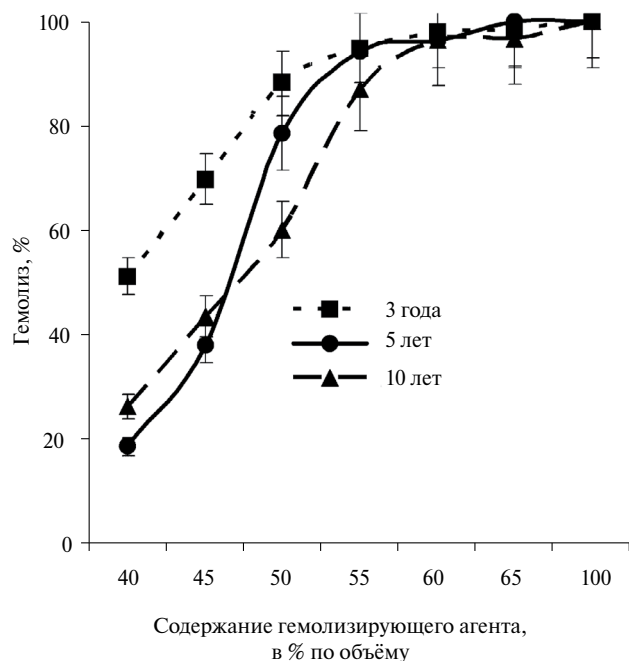


Рис. 1. Осмотическая стойкость эритроцитов морских зайцев различного возраста.

экстрадуральной внутривerteбральной вены с помощью спинальной иглы (1.2×90 мм), а затем сразу же помещали в пробирки для сбора крови, используя гепарин в качестве антикоагулянта. Эритроциты получали через 2–4 часа после взятия крови. Плазму отделяли центрифугированием в течение десяти минут со скоростью 1500 об/мин. Эритроциты трехкратно отмывали охлажденным изотоническим раствором хлористого натрия. Для этого к осадку эритроцитов добавляли двукратный объем физиологического раствора. Пробы центрифугировали и отбирали надосадочную жидкость. Осмотическую стойкость эритроцитов определяли в день отбора проб. В этот же день получали гемолизаты эритроцитов и замораживали их. Определение метаболитов в гемолизатах после размораживания проводили в стационарных лабораторных условиях через 2–3 недели.

Осмотическую стойкость эритроцитов оценивали методом, основанным на определении степени гемоллиза в среде с разным объемным содержанием изотонических растворов хлористого натрия и мочевины (Камышников, 2000). Гемолизаты эритроцитов получали по методу Драбкина (Drabkin, 1949). Биохимические показатели в гемолизатах эритроцитов определяли на анализаторе ROKI (Беларусь), используя наборы реагентов для биохимических исследований производства НПФ «Абрис+» (Россия). Содержание глюкозы и молочной кислоты определяли энзиматическими колориметрическими методами, кальция — по реакции

с хромогеном Арсеназо III, фосфора — реакцией с молибдатом аммония, магния — реакцией с ксиллиловым синим, натрия — реакцией с уранилацетатом, калия — турбидиметрическим методом реакцией с тетрафенилборатом (Энциклопедия..., 1997).

Статистическую обработку цифрового материала проводили методами вариационной статистики с использованием программ Microsoft Excel Windows XP и Statistica 6.0. О нормальности распределения судили по показателям асимметрии и эксцесса. Достоверность различий между средними величинами оценивали при помощи критерия Стьюдента, различия при $p < 0.05$ рассматривались как статистически значимые.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Осмотическая стойкость эритроцитов (ОСЭ) является интегральным тестом, характеризующим изменение антиоксидантного статуса организма, и претерпевает сдвиги в сторону снижения при многих физиологических и патологических состояниях, сопровождающихся активацией свободно-радикального окисления липидов. Полученные показатели осмотической стойкости эритроцитов морских зайцев представлены в виде кривых гемоллиза, характеризующих зависимость степени гемоллиза (%) от концентрации гемолизирующего агента (рис. 1).

Эритроциты морских зайцев так же, как и у других видов морских млекопитающих (Ерохина, Кавцевич, 2007), более чувствительны к гемолизирующим воздействиям по сравнению с наземными животными и человеком, что выражается в сдвиге кривой гемоллиза влево. Количество гемолизированных эритроцитов достигает от 18 до 50% в разных возрастных группах даже при минимальном содержании гемолизирующего агента, тогда как для эритроцитов человека этот показатель в норме не более 3% (Камышников, 2000). При этом ОСЭ изменяется в процессе развития животных, повышаясь с возрастом (рис. 1). В наибольшей степени возрастные различия в чувствительности эритроцитарных мембран к гемолизу проявляются при низких концентрациях гемолизирующего агента (40–50% по объему). Повышение с возрастом устойчивости эритроцитов к гемолизу вполне объяснимо известным фактом совершенствования процессов регуляции, направленных на контролирование метаболизма с целью быстрой приспособляемости его к условиям окружающей среды.

Особенности реагирования эритроцитарных мембран морских млекопитающих на гемолизирующие воздействия объясняют химическим составом, в частности высоким содержанием лецитина, что способствует повышенной проницаемости

клеток и более активному обмену эритроцитов с окружающей средой (Гелетюк и др., 1972). Кроме того, в процессе гемолиза определенное значение может иметь содержание гемоглобина в эритроцитах и его способность связывать кислород (Куликов и др., 1988). Представляется, что появляющиеся в крови супероксидные анионы взаимодействуют с оксигемоглобином, в результате чего происходит образование метгемоглобина и перекиси водорода. Образующийся комплекс обладает свойствами сильного окислителя и отвечает за гемолиз эритроцитов. Повышенное по сравнению с наземными животными содержание гемоглобина в эритроцитах морских млекопитающих (особенно ластоногих) в свете вышеупомянутых представлений может частично объяснять низкую осмотическую стойкость эритроцитов последних.

Состояние мембран зависит и от внутриэритроцитарного метаболизма. Глюкоза является основным субстратом, а молочная кислота — конечным продуктом гликолиза, единственного пути получения энергии в этих клетках. Содержание глюкозы в эритроцитах морских зайцев находится в пределах 0.40–0.71 ммоль/л, что существенно ниже, чем у дельфинов-афалин соответствующего возраста, в эритроцитах которых уровень глюкозы достигает 5.06 ± 0.08 ммоль/л (Каганова и др., 2002), и у наземных млекопитающих (4.42 ± 0.55 ммоль/л у крыс) (Скверчинская и др., 2013). Не исключено, что такое низкое содержание связано с выходом глюкозы из эритроцитов для поддержания ее нормального уровня в плазме крови. Однако сведений об этом в литературе не найдено. К тому же известно о роли адсорбционно-транспортной функции эритроцитов в поддержании уровня метаболитов плазмы, когда избыточная часть отдельных соединений адсорбируется на мембране эритроцита и по мере необходимости может транспортироваться обратно в плазму. Наши исследования смывов с эритроцитарных мембран у морских зайцев показали присутствие глюкозы в пределах 0.2–0.4 ммоль/л (неопубликованные данные), что сопоставимо с данными у других видов млекопитающих. Маловероятно, что для предотвращения критического снижения уровня глюкозы в плазме происходит транспорт ее из внутриэритроцитарного пула. К тому же острой необходимости в этом нет, судя по содержанию глюкозы в плазме исследованных животных (1.9–5.2 ммоль/л) (Erokhina, Kavtsevich, 2019), сопоставимому с данными (Tryland *et al.*, 2021) для взрослых морских зайцев (2.89–10.71 ммоль/л). Очевидно, этот вопрос требует дальнейшего изучения. При этом возрастные изменения данного показателя имеют однонаправленный характер — как и у представителя китообразных, у представителя ластоногих морского зайца в старшем

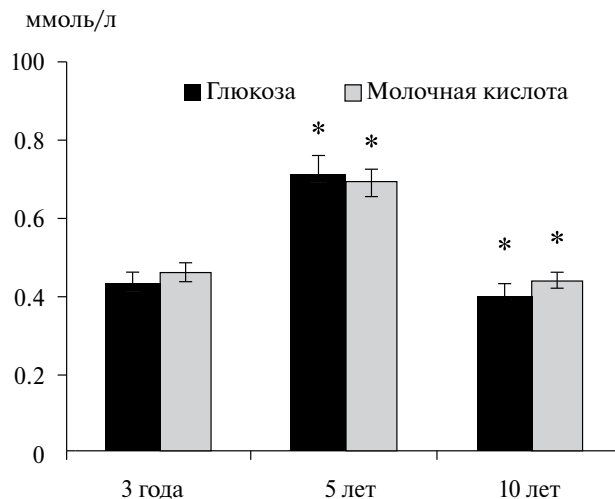


Рис. 2. Содержание метаболитов гликолиза в гемолизатах эритроцитов морских зайцев различного возраста.

Здесь и далее знаком “*” отмечены статистически значимые различия по сравнению с предыдущим периодом развития.

возрасте концентрация глюкозы в эритроцитах снижается ($p < 0.001$) (рис. 2). Отметим заметное (более чем в полтора раза) повышение ($p < 0.001$) уровня глюкозы к 5-летнему возрасту, очевидно, связанное с общей интенсификацией метаболизма в период полового созревания, и в дальнейшем уменьшение ($p < 0.001$) значения этого показателя к 10-летнему возрасту. Такие же изменения наблюдаются и в содержании в эритроцитах морских зайцев конечного продукта гликолиза — молочной кислоты (рис. 2).

Таким образом, судя по этим двум показателям, интенсивность гликолитических реакций в эритроцитах морских зайцев с возрастом снижается, как и у других млекопитающих и человека (Коркушко и др., 2009).

Кроме метаболитов гликолиза определяли уровень катионов, играющих важную регуляторную роль в эритроцитах. Содержание натрия в эритроцитах изученных морских зайцев находится в пределах 19.58–22.37 ммоль/л, калия — 74.41–96.57 ммоль/л (рис. 3).

Для сравнения, в эритроцитах человека концентрация натрия в норме 13–22 ммоль/л, калия — 79.8–99.3 ммоль/л (Лифшиц, Сидельникова, 2006), в эритроцитах ряда пресноводных рыб концентрация натрия 18.2–65.6 ммоль/л, калия — 65.7–111.0 ммоль/л (Запруднова, 2017). Соотношение ионов натрия и калия в клетке оказывает, наряду с другими факторами, существенное влияние на активность Na^+ , K^+ -АТФазы. Этому ферменту принадлежит ведущая роль в поддержании

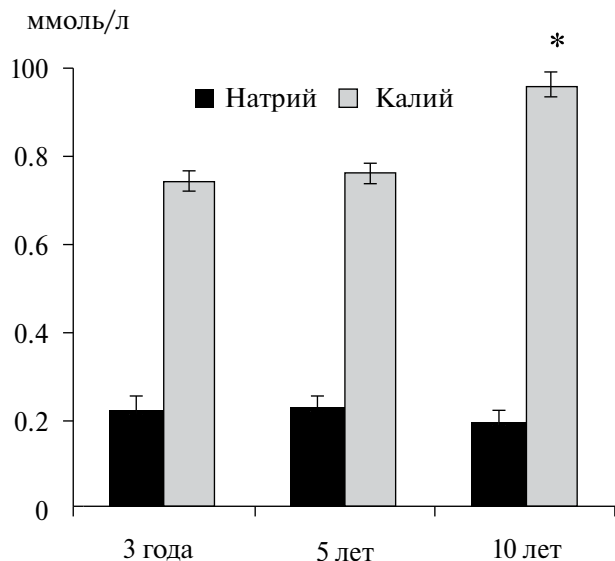


Рис. 3. Содержание натрия и калия в гемолизатах эритроцитов морских зайцев различного возраста.

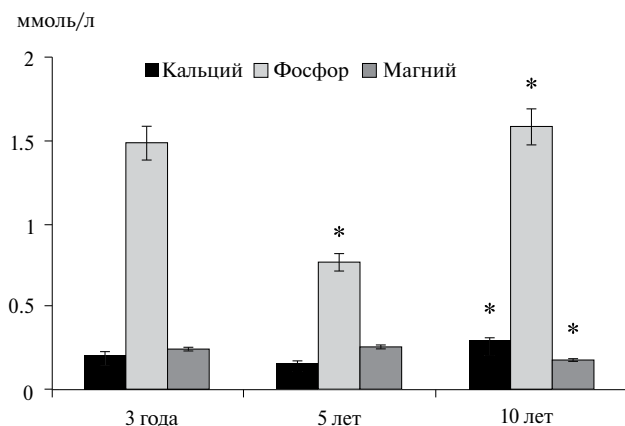


Рис. 4. Содержание кальция, фосфора и магния в гемолизатах эритроцитов морских зайцев различного возраста.

объема и формы эритроцитов как важного условия их функциональной активности. Показано, что основную регуляторную роль в активности Na^+ , K^+ -АТФазы играют ионы калия, а ионы натрия оказывают незначительное влияние (Мосягин и др., 2010). У изученных морских зайцев содержание натрия в эритроцитах не изменяется с возрастом, тогда как концентрация калия статистически значимо ($p < 0.001$) увеличивается у взрослых животных. Мы не располагаем сведениями об ионном составе эритроцитов у других видов морских млекопитающих, поэтому можем сравнивать полученные результаты лишь с данными для эритроцитов

человека. Так, у человека с возрастом концентрация внутриэритроцитарного натрия увеличивается, а калия — уменьшается вследствие торможения гликолиза и уменьшения концентрации АТФ. При этом снижается активность Na^+ , K^+ -АТФазы, что приводит к выходу K^+ и входу Na^+ в клетку (Коркушко и др., 2009). Возможно, что наблюдаемое у морских зайцев повышение с возрастом уровня внутриэритроцитарного калия обеспечивает, наряду с другими механизмами, устойчивость к гипоксии, как это описано для рыб (Запруднова, 2017).

Уровень кальция в эритроцитах морских зайцев статистически значимо увеличивается к 10-летнему возрасту (рис. 4), косвенно указывая на интенсификацию работы калий-натриевого насоса в клетках (Engelman, Duhm, 1987). Содержание фосфора в эритроцитах взрослых животных не отличается от такового в возрасте 3 года, при этом статистически значимо снижается вдвое в период полового созревания (5 лет). Концентрация магния в эритроцитах снижается к 10-летнему возрасту. Как известно (Мисюра, Богданова, 1997), с ионами магния связана часть фосфатных соединений эритроцитов. Магний снижает сродство фосфатов к гемоглобину, тем самым повышая сродство последнего к кислороду. Можно предположить, что кислородсвязывающая способность гемоглобина в эритроцитах молодых животных регулируется магнием, влияние которого снижается к тому моменту, когда эта способность поддерживается за счет высокой концентрации гемоглобина.

Таким образом, исследование ряда показателей метаболизма эритроцитов у морских зайцев различного возраста показало, что устойчивость мембран эритроцитов к гемолизирующим воздействиям повышается к периоду полового созревания и в дальнейшем сохраняется на том же уровне. Установлено, что в эритроцитах морских зайцев в период полового созревания интенсивность гликолиза повышается и затем снижается у взрослых животных. С возрастом изменяется концентрация некоторых катионов — повышается уровень внутриэритроцитарного калия, но снижается содержание магния. Предполагается, что эти изменения отражают роль регуляторных катионов в устойчивости к гипоксии и кислородсвязывающей способности гемоглобина в эритроцитах.

Автор выражает благодарность сотрудникам лаборатории морских млекопитающих ММБИ РАН Н. Н. Кавцевичу, В. Н. Светочеву, О. Н. Светочевой за отбор и первичную обработку проб крови животных во время экспедиций.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках темы госзадания ММБИ РАН “Экология и физиология морских млекопитающих арктических морей” (№ гос. регистрации 121091600101-6).

ЭТИЧЕСКОЕ ОДОБРЕНИЕ

Исследование одобрено комиссией по биоэтике Мурманского морского биологического института РАН (Заключение № 2 о соответствии исследования действующим международным нормам, рекомендациям, законам и иным нормативным актам Российской Федерации, нормам этического проведения исследований) с использованием животных от 27 декабря 2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор данной работы заявляет, что у него нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гелетюк В.В., Маминов М.К., Анбиндер Е.М. Некоторые показатели крови выдры, двух видов настоящих тюленей и наземных хищных // Тез. докл. V Всес. совещ. по изучению морских млекопитающих / Махачкала, сентябрь 1972 г. Махачкала, 1972. Ч. 2. С. 59–62.
- Ерохина И.А., Кавцевич Н.Н. Чувствительность эритроцитов морских млекопитающих к осмотическому лизису // Вет. практика. 2007. № 3 (38). С. 60–63.
- Запруднова Р.А. Эритроцитарные катионы в адаптационных процессах у окуня *Perca fluviatilis* L. (Percidae) // Тр. Карельского НЦ РАН. 2017. № 12. С. 57–62.
<https://doi.org/10.17075/eb590>
- Каганова Н.В., Коношенко С.В., Ларина М.В. Состояние внутриэритроцитарного метаболизма у дельфинов-афалин при адаптации к условиям океанариума // Морские биотехнические системы. Вып. 2. Севастополь, 2002. С. 173–181.
- Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2т. Т. 2. Минск: Беларусь. 2000. С. 209–210.
- Коркушко О.В., Иванов Л.А., Писарук А.В., Чеботарев Р.Д. Дыхательная функция крови в пожилом и старческом возрасте и факторы, ее определяющие // Физиол. чел. 2009. Т. 35, № 2. С. 40–46.
- Куликов В.Ю., Семенюк А.В., Колесникова Л.И. Перекисное окисление липидов и холодовой фактор. Новосибирск: Наука, 1988. 192 с.
- Лифшиц В.М., Сидельникова В.И. Биохимические анализы в клинике. Справочник. М.: «Триада-Х», 2006. 216 с.
- Минзюк Т.В., Кавцевич Н.Н., Светочев В.Н. Новые данные о клеточном составе крови морского зайца // Докл. Академии наук. 2015. Т. 462, № 6. С. 727–729.
<https://doi.org/10.7868/S0869565215180255>
- Мисюра А.Г., Богданова Л.Н. Система крови черноморской афалины // Черноморская афалина *Tursiops truncatus ponticus*: морфология, физиология, акустика, гидродинамика. М.: Наука, 1997. С. 186–213.
- Мосягин В.В., Максимов В.И., Фурман Ю.В. Активность АТФаз эритроцитов свиней // Докл. Росс. Акад. сельскохозяйств. наук. 2010. № 5. С. 38–39.
- Рожнов В.В. Крупные млекопитающие как виды-индикаторы состояния экосистем в Российской Арктике // Научно-технические проблемы освоения Арктики. М.: Наука, 2015. С. 286–297.
- Светочев В.Н., Кавцевич Н.Н. Результаты мечения морского зайца (*Erignathus barbatus*) датчиками спутниковой телеметрии в Мезенском заливе Белого моря в июле 2017 г. // Евраз. Науч. Объед. 2019. № 1–3 (47). С. 126–129.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.2560091>
- Светочева О.Н., Светочев В.Н., Кавцевич Н.Н. Суточная активность и бюджет энергии морского зайца (*Erignathus barbatus*) в Белом море // Евраз. науч. объедин. 2017. Т. 1. № 3 (28). С. 53–56.
- Скверчинская Е.А., Тавровская Т.В., Новожилов А.В. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы эритроцитов крыс при продолжительном алиментарном голодании // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2013. Т. 49, № 2. С. 144–152.
- Энциклопедия клинических лабораторных тестов / Под ред Н. Тица. М.: Лабинформ, 1997. 960 с.
- Andersen M., Hjelset A.M., Gjertz J., Lydersen C., Gulliksen B. Growth, age and sexual maturity and condition in bearded seals (*Erignathus barbatus*) from Svalbard, Norway // Polar Biol. 1999. V. 21. P. 179–185.
- Charmain D.H., Kovacs K.M., Lydersen C. Individual variability in diving, movement and activity patterns of adult bearded seals in Svalbard, Norway // Scient. Rep. 2018. № 8. 16988.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-35306-6>
- Charrier J., Mathevon N., Aubin T. Bearded seal males perceive geographic variation in their trills // Behav. Ecol. and Sociobiol. 2013. V. 67. P. 1679–1689.
<https://doi.org/10.1007/s00265-013-1578-6>
- Drabkin D. A simplified technique for large scale crystallization of myoglobin and haemoglobin in the crystalline // Arch. Biochem. 1949. V. 21. P. 224–226.
- Engelman B., Duhm J. Intracellular calcium content of human erythrocytes: relation to sodium transport systems // J. Membrane Biol. 1987. V. 98. P. 79–87.
- Erokhina I.A., Kavtsevich N.N. Blood plasma chemistry in White Sea bearded seals across different age groups // Arctic Envir. Res. 2019. V. 19. № 4. P. 159–165.
<https://doi.org/10.3897/issn2541-8416.2019.19.4.159>
- Fair P.A., Becker P.R. Review of stress in marine mammals // J. Aquat. Ecosyst. Stress and Recovery. 2000. V. 7 (4). P. 335–354.
<https://doi.org/10.1023/A:1009968113079>
- Goertz C.E.C., Reichmuth C., Thometz N.M., Ziel H., Boveng P. Comparative health assessments of Alaskan ice seals // Front. Vet. Sci. 2019. V. 6. Article 4.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00004>

Johannessen O.M., Miles M.W. Critical vulnerabilities of marine and sea ice-based ecosystems in the high Arctic // Reg. Envir. Change. 2011. V. 11 (Suppl. 1). P. S239–S248.
<https://doi.org/10.1007/s10113-010-0186-5>

Tryland M., Lydersen C., Kovacs K., Rafter E., Thoresen S. Serum biochemistry and haematology in wild and captive bearded seals (*Erignathus barbatus*) from Svalbard, Norway // Acta Vet. Scand. 2021. V. 63. № 1. P. 33–39.
<https://doi.org/10.1186/s13028-021-00598-8>

Physiological and Biochemical Parameters of Erythrocytes in White Sea Bearded Seals *Erignathus barbatus barbatus* Erxleben, 1777 (Phocidae) across Different Age Groups

I. A. Erokhina^{1, #}

Murmansk Marine Biological Institute of the Russian Academy of Sciences, Vladimirskaia st., 17, Murmansk, 183010 Russia

[#]*e-mail: irina.erohina58@mail.ru*

A comparative study of some parameters of erythrocytes of bearded seals of different ages (3 years, 5 years, 10 years) was carried out. It has been established that with age, the resistance of erythrocyte membranes to hemolysis increases. During puberty, the intensity of glycolysis in the bearded seals erythrocytes increases and then decreases in adult animals. Differences in the content of potassium, calcium, magnesium in the erythrocytes of animals of the studied age groups are shown.

Keywords: bearded seal, *Erignathus barbatus*, blood, erythrocytes, metabolism