

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Номер 5, 2022

---

---

## БИОХИМИЯ

Наноматериалы для направленного изменения параметров электрохимических биосенсоров и биотопливных элементов

*Ю. В. Плеханова, А. Н. Решетилов*

451

---

## ГЕНЕТИКА

Разнообразие аллелей главного комплекса гистосовместимости у обыкновенного хомяка (*Cricetus cricetus*) в городской и сельской популяциях

*Н. Ю. Феоктистова, И. Г. Мещерский, Т. Н. Карманова, А. В. Гуреева, А. В. Суров*

470

Фенотипическая изменчивость и наследование нетипичной формы anterior lobe M<sup>1</sup> копытных леммингов (*Dicrostonyx*, Rodentia, Arvicolinae)

*М. И. Чепраков*

482

---

## ЗООЛОГИЯ

Жизненный цикл трематоды *Maritrema misenense* в Черном море

*Ю. В. Белоусова*

489

Этологические особенности при формировании аппарата движения костистых рыб (на примере радужной форели *Oncorhynchus mykisswalbaum*)

*В. П. Панов, С. С. Сафонова, И. В. Байдаров*

495

Гигантские клетки кортикальной глии в центральной нервной системе насекомых

*А. А. Панов*

509

---

## ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Флуориметрический метод оценки активности целлюлаз в пищеварительном тракте мелких травоядных млекопитающих

*А. А. Варшавский, Е. И. Наумова*

522

Стимуляция заживления ожоговых РАН у крыс наносекундным импульсно-периодическим микроволновым излучением

*А. А. Гостюхина, А. В. Самойлова, М. А. Большаков, В. М. Мочалова, К. В. Зайцев, О. П. Кутенков, В. В. Ростов*

530

---

## ЭКОЛОГИЯ

Временные изменения содержания полиаренов в образцах сезонно—талого слоя тундровых торфяников в условиях модельного эксперимента

*Е. В. Яковлева, Д. Н. Габов*

538

Новые данные по распространению кабарги (*Moschus moschiferus*) в Якутии

*А. В. Аргунов, В. М. Сафронов*

549

---

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Первая регистрация вибрационных сигналов у мух рода *Meromyza* (Diptera, Chloropidae)

*А. А. Яцук, Л. С. Шестаков*

555

---

---

# Contents

---

---

No. 5, 2022

---

---

## Biochemistry

Nanomaterials for Controlled Adjustment of Electrochemical Biosensors and Biofuel Cells Parametres

*Y. V. Plekhanova and A. N. Reshetilov* 451

---

## Genetics

Allele diversity of the Major Histocompatibility Complex in the Common Hamster (*Cricetus cricetus*) in Urban and Rural Populations

*N. Y. Feoktistova, I. G. Meschersky, T. N. Karmanova, A. V. Gureeva, and A. V. Surov* 470

Phenotypic Variation and Inheritance of an Atypical form of the Anterior Lobe of the M1 of Collared Lemmings (*Dicrostonyx*, Rodentia, Arvicolinae)

*M. I. Cheprakov* 482

---

## Zoology

Life Cycle of the Trematode *Maritrema misenense* (Trematoda: Microphallidae) in the Black Sea

*Y. V. Belousova* 489

Ethological Features in the Bony Fish Apparatus of Movement (on the Example of the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykisswalbaum*)

*V. P. Panov, S. S. Safonova, and I. V. Baydarov* 495

Giant Cortex Glia Cells in the Insect Central Nervous System

*A. A. Panov* 509

---

## Animal and Human Physiology

Fluorimetric Method of Cellobiohydrolase Activity Estimation in Digestive Tract of Small Herbivorous Mammals

*A. A. Varshavskiy and E. I. Naumova* 522

Stimulation of Burn Wound Healing in Rats by Nanosecond Repetitive Pulsed Microwave

*A. A. Gostyukhina, A. V. Samoylova, M. A. Bolshakov, V. M. Mochalova, K. V. Zaitsev, O. P. Kutenkov, and V. V. Rostov* 530

---

## Ecology

Temporal Changes in the Content of Polyarenes in Samples of Seasonally Thawed Layer from Tundra Peatlands During a Model Experiment

*E. V. Yakovleva and D. N. Gabov* 538

New Data on the Distribution of Musk Deer (*Moschus moschiferus*) in Yakutia

*A. V. Argunov and V. M. Safronov* 549

---

## Short Communications

The First Data of Vibration Signals in Flies of the Genus *Meromyza* (Diptera, Chloropidae)

*A. A. Yatsuk and L. S. Shestakov* 555

---

---



УДК 544.6.076:543.9

## НАНОМАТЕРИАЛЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО ИЗМЕНЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ И БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

© 2022 г. Ю. В. Плеханова\*, @, А. Н. Решетилов\*

\*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, ФГБУН “ФИЦ ПНЦБИ РАН”, проспект Науки, 5, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

@E-mail: plekhanova@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 02.04.2021 г.

После доработки 10.06.2021 г.

Принята к публикации 10.06.2021 г.

Представлены обобщения последних достижений в области создания биосенсоров (БС) и биотопливных элементов (БТЭ) при использовании наноматериалов (НМ). НМ рассматриваются как элементы, способные изменять характеристики биораспознавания за счет взаимодействия с биоматериалом. Основные эффекты НМ обусловлены их способностью увеличивать электропроводность и эффективную поверхность биорецепторной части. Суммированы представления, полученные отечественными и зарубежными учеными, о возможных механизмах действия НМ. Рассмотрены перспективы применения НМ при создании БС и БТЭ.

*Ключевые слова:* электрохимический биосенсор, биотопливный элемент, наноматериалы

DOI: 10.31857/S1026347022040126

В последнее десятилетие появилось огромное количество данных, связанных с использованием наноматериалов (НМ) в различных областях человеческой деятельности, в том числе и при создании биосенсоров (БС) и биотопливных элементов (БТЭ). Задача рассмотреть все описанные типы НМ и привести в единую систему их взаимодействия с биоматериалами (БМ) достаточно сложна, тем не менее в настоящее время общие закономерности уже стали проявляться, поскольку в основном определен тип БМ, используемый в БС и БТЭ.

Показано, что применение НМ в биоэлектрохимических системах приводит к уменьшению сопротивления электродов, т.е. к облегчению передачи заряда от биорецептора к электроду, росту амплитуды полезного сигнала, увеличению полезной площади электрода и т.п. (Kumar *et al.*, 2018; Kucherenko *et al.*, 2019; Hwang *et al.*, 2020). Использование НМ ведет к созданию электродов, содержащих мембраны с определенными размерами и формой пор, необходимой механической гибкостью, прочностью, улучшенными адгезионными свойствами, гидрофильностью/гидрофобностью, наличием определенных функциональных групп на их поверхности (Plachá, Jampilek, 2019; Arora, Attri, 2020). НМ позволяют реализовать общую тенденцию, которая определяется словами “макро-микро-нано” (Решетилов и др., 2020),

подразумевая создание новых БС и БТЭ все более малого размера. Один из первых примеров движения в данном направлении можно найти в работе Карубе (Sasaki, Karube, 1999). В ней была показана возможность создавать миниатюрные, по меркам того времени, системы множественного БТЭ, содержащего 25 одиночных элементов и имеющего размер  $40 \times 50$  мм<sup>2</sup>. Настоящее время характеризуется продолжением разработок по снижению размеров БС и БТЭ. Описано формирование функциональных наноэлементов (использовали золотые проволоки с наночастицами (НЧ) золота), на основе которых создаются контактные линзы (Falk *et al.*, 2013), вживляемые в организм крыс (Andorolov *et al.*, 2013); БТЭ на основе многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ), которые вживляются в кролика (El Ichi-Ribault *et al.*, 2018) или в форме татуировки наносятся на кожу человека (Escalona-Villalpando *et al.*, 2019). Рассматривая процесс “макро-микро-нано” отметим, что высокоактуальным в настоящее время является разработка медицинских систем, получивших название point-of-care technologies (POCT), которые можно определить как анализирующие устройства, расположенные рядом или на поверхности организма пациента (Gonzalez-Solino, Lorenzo, 2018; Sun *et al.*, 2021). Для указанной цели широко используются НМ, значительно расширяющие аналити-

ческие возможности исследователей и практикующих врачей.

Целью данного обзора является представление данных, описывающих влияние различных типов НМ на свойства биораспознающих элементов электрохимических БС и БТЭ; оценка интегральной возможности изменения биоэлектрохимических параметров и характеристик биораспознающих элементов, обусловленных присутствием НМ.

#### НАНОМАТЕРИАЛЫ: ТИПЫ. ПРИМЕНЕНИЕ. СВОЙСТВА

По определению, к НМ относят объекты, размер которых заключен в диапазоне 1.0–100 нм (Miernicki *et al.*, 2019; Sheikhzadeh *et al.*, 2020). Обладая уникальными свойствами, отличающимися от аналогичных свойств материалов микро- и макроразмеров, они находят все новые области применения. Постоянно происходит развитие методов их получения, а также изменения их свойств с помощью различных (химических, механических и др.) воздействий. Выяснено, что свойства НМ зависят от их природы, размера и формы, метода их получения.

На рис. 1 представлен вариант возможной классификации НМ, в которой учитывается зависимость от размера частиц, геометрическая и физическая размерность, морфология, химический состав. В работе (Saleh, 2020) представлен обзор существующих в настоящее время наноматериалов и описаны их свойства. Применительно к БС и БТЭ наиболее часто используют классификацию, основанную на химическом составе НМ; при этом выделяют как однокомпонентные НМ, так и нанокompозиты, имеющие в своем составе дополнительные включения.

В табл. 1 представлены некоторые примеры применения различных типов НМ при создании БС. Как видно из табл. 1, основные области применения таких модифицированных биосенсоров – это медицина, охрана окружающей среды и биотехнология. При этом зачастую для модификации электрода в составе БС используют не один НМ, а несколько одновременно – НЧ нескольких металлов или их оксидов, или НЧ металлов и углеродные НМ, что приводит к изменению аналитических характеристик биоэлектрохимических устройств. В табл. 2 приведены некоторые примеры применения НМ в ферментных и микробных биотопливных элементах, при этом указывается на какую характеристику больше всего повлияло применение НМ.

Применение НМ в электрохимических БС и БТЭ связано с их уникальными свойствами (Khan *et al.*, 2019; Asha, Narain, 2020). Для БС и БТЭ прежде всего это высокое соотношение между площадью поверхности НЧ и их объемом. Боль-

шая удельная поверхность приводит к значительной адсорбции биологических объектов на поверхности НМ. Особенности адсорбции определяются размерным эффектом; кристаллической структурой поверхности НЧ; наличием дефектов на поверхности НЧ; возможностью получения трехмерных композиций, позволяющих создавать особую среду вокруг клеток или ферментов, сохраняющих их каталитическую активность в течение длительного времени (Perveen *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2019; Shakeel *et al.*, 2019; Tahar *et al.*, 2019).

НМ проявляют высокую каталитическую активность в химических реакциях из-за большого количества координационно ненасыщенных атомов, расположенных на поверхности, краях и углах НЧ, по сравнению с общим числом атомов (Navalón, García, 2016). Адсорбция НЧ на поверхности электрода приводит к стабилизации НЧ, выступает в качестве каркаса для иммобилизации биокатализатора и позволяет использовать каталитическую активность НЧ для усиления сигнала БС (Zhou *et al.*, 2021), в качестве замены ферментной метки в иммуносенсорах (Tao *et al.*, 2020) или одного из ферментов в каскадных реакциях при окислении или восстановлении одного из реагентов в ферментных БС (Smutok *et al.*, 2021).

Электрические свойства НМ, что важно для электрохимических устройств, связаны с квантово-размерным эффектом и эффектом квантового ограничения. Известно, что некоторые металлы (например, медь) при получении наночастиц теряют проводимость, тогда как изоляционные материалы (например, диоксид кремния) наоборот становятся проводящими (Shi *et al.*, 2015). Для нанопроволок и нанотрубок характерно, что при уменьшении диаметра ниже 20 нм из-за увеличения поверхностного рассеяния электронов и фононов, увеличения площади поверхности и очень высокой плотности электронных состояний, проводимость резко возрастает по сравнению с объемными материалами. Таким образом, уменьшение структур до наноразмеров приводит к снижению удельного сопротивления и увеличению проводимости, что в свою очередь ведет к возрастанию сигналов БС и БТЭ, модифицированных НМ (Тарасов и др., 2020), позволяя в некоторых случаях отказываться от медиаторов – искусственных акцепторов электронов (Christwardana *et al.*, 2018; Tahar *et al.*, 2019).

Растворы, содержащие НЧ, относятся к дисперсионным системам, где на границе раздела “частица-дисперсионная среда” возникает двойной электрический слой (ДЭС). Частью ДЭС является дзета-потенциал, определяющий степень и характер взаимодействия между частицами дисперсной системы. Исследование дзета-потенциала позволяет изучать поверхностные свойства НЧ

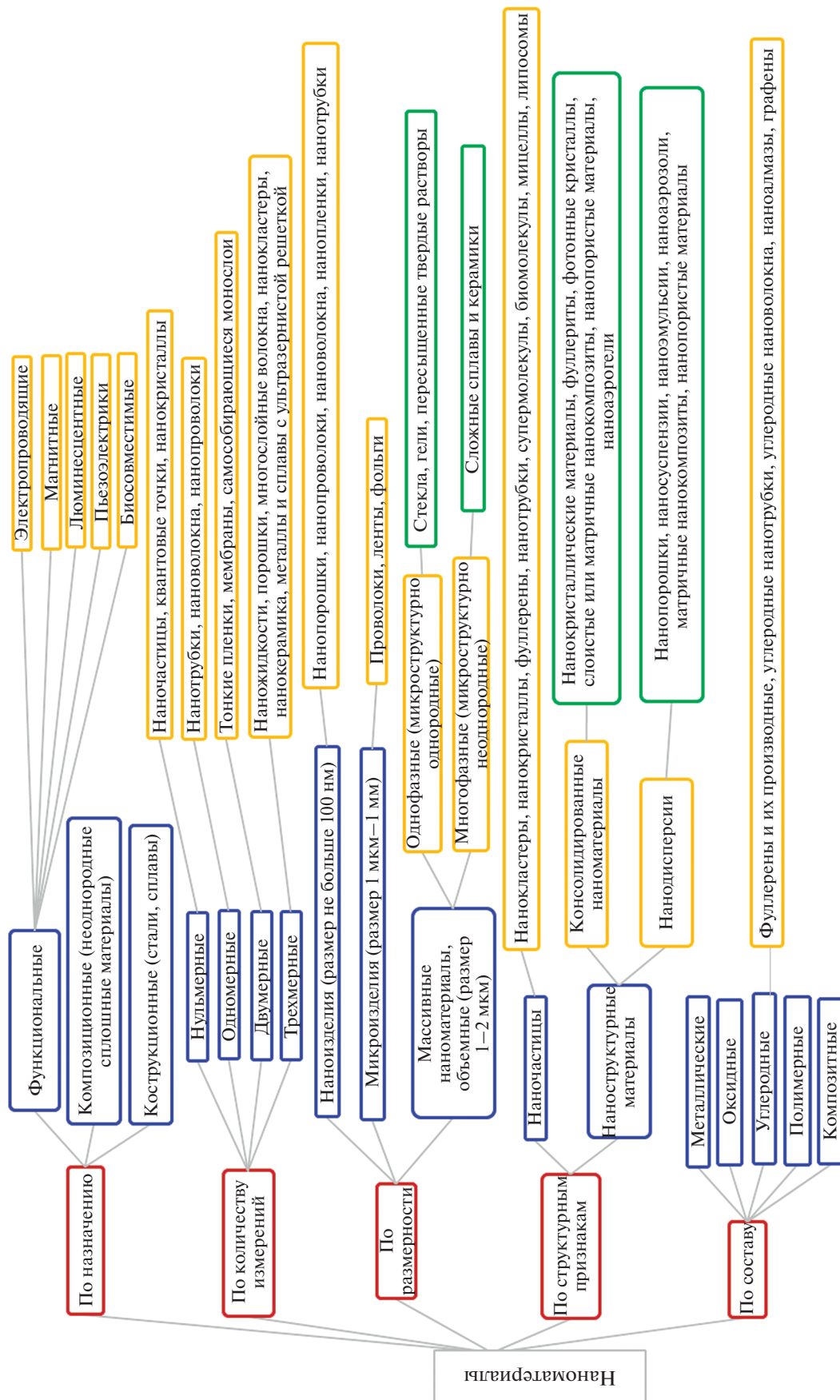


Рис. 1. Классификация наноматериалов.

Таблица 1. Примеры практического применения электрохимических биосенсоров, модифицированных наноматериалами

Область применения	Тип наноматериала	Анализируемое соединение	Биокатализатор	Стабильность	Пределы определения	Ссылка
Медицина	КТ CdTe	МикроРНК мутации гена 1 рака молочной железы	Нуклеаза	Уменьшение сигнала на 4.8% в течение 30 дней	1.2 мкМ в образцах сыроворотки	Yang <i>et al.</i> , 2019
	КТ антимонена	Определение H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> у больных с диагно-стированным раком СА-125	Каталаза	Электрохимически стабилен до 30 циклов	4.4 мкМ	Fatima <i>et al.</i> , 2020
	ОУНТ/НЧ Au в качестве метки антител	Хорионический гонадотропин человека	Антитела	—	5 пг/мл	Viet <i>et al.</i> , 2019
	МУНТ/НЧ Cu	L-молочная кислота	Лактатооксидаза	Сохранение 60% активности от первоначальной через 140 дней	0.25 мкМ	Dagar, Pundir, 2017
	Графен/НЧ Pt	Глюкоза в крови и в поте	Глюкозооксидаза	—	300 нМ	Yoon <i>et al.</i> , 2020
	НЧ оксида графена	L-лизин в образцах сыворотки	L-лизиноксидаза	Снижение сигнала на 35% при непрерывном использовании в течение 230 раз	0.01 мкМ	Nohwal <i>et al.</i> , 2020
	НЧ Pt	Бактерии <i>Salmonella</i>	Антитела	—	13 КОЕ/мл	Wang <i>et al.</i> , 2020
	НЧ ZnO, Ag	Ксантин	Ксантиноксидаза	Сохранение 77% активности от первоначальной через 20 дней хранения	0.07 мкМ	Sahyar <i>et al.</i> , 2019
	НЧ ZnO/CuO	C-реактивный белок	Антитела	—	16 пг/мл	Cao <i>et al.</i> , 2020
	Наностержни ZnO	Глюкоза	Глюкозооксидаза	—	10 мкМ	Bagyalakshmi <i>et al.</i> , 2020
	Нанокластеры платиновой сажи/анатаз	Холестерин в крови	Холестериноксидаза	96.4% активности от первоначальной через 30 дней	960 нМ	Lee <i>et al.</i> , 2021

Таблица 1. Окончание

Область применения	Тип наноматериала	Анализируемое соединение	Биокатализатор	Стабильность	Пределы определения	Ссылка	
Охрана окружающей среды	ОУНТ	Пестицид метилпарагидон в образцах фруктов	Ацетилхолинэстераза	Снижение сигнала на 7% после хранения в течение 33 дней	$3.75 \times 10^{-11}$ М	Kumar, Sundramoorthy, 2019	
	МУНТ	Фенольные соединения	Лакказы	77% от первоначальной активности через 10 циклов и 86% через 30 дней	0.002 мкМ	Othman, Wollenberger, 2020	
	Графен/НЧ Au и Cu <sub>2</sub> O	Фосфаты в продуктах питания	Пируватоксидаза	87.8% от первоначальной активности через 9 дней	0.4 нМ	He, Liu, 2020	
	Восстановленный оксид графена и хитозан	Метилпарагидон в образцах овощей	Гемоглобин	92.5% от первоначальной активности через 21 дней	79.77 нМ	Kaur et al., 2020	
	НЧ Au	As (III)	<i>Alcaligenes faecalis</i>	15 циклов	6.61 мкмоль	Núñez et al., 2020	
	НЧ Au	Полифенолы в прополисе	Лакказы	85% от первоначальной активности через месяц	1 мкМ	Mohtar et al., 2019	
	Золотые наностержни/ мезопористые НЧ SiO <sub>2</sub>	Фосфорорганические пестициды	Ацетилхолинэстераза	98% от первоначальной активности через 30 дней	1.3 нМ	Cui et al., 2019	
	Биотехнология	НЧ ZnO/МУНТ/ полианилин	L-аминокислоты во фруктовых соках	L-аминокислотная оксидаза	70% от первоначальной активности через 120 дней	0.35 мкМ	Lata et al., 20136
		МУНТ	Этиловый спирт	<i>Glucosacetobacter sucrofermentas</i>	—	0.015 мМ	Plekhanova et al., 2019
		НЧ Au	Метанол в яблочном соке	<i>Methylobacterium organophilium</i>	69% от первоначальной активности через 60 дней	0.047 мМ	Wen et al., 2014
НЧ ZnO/МУНТ	Теофиллин в фармацевтических препаратах	Цитохром с	В течение 5 дней сигнал не изменялся	0.0012 мкМ	Kilele et al., 2020		

Примечание. ОУНТ – одностенные углеродные нанотрубки, остальные обозначения в тексте для табл. 1, 2.

Таблица 2. Применение НМ в ферментных и микробных биотопливных элементах

НМ	Роль НЧ	Биоматериал/ топливо	Медиатор	Плотность тока	Время жизни	Мощность	Ссылка
НЧ Ag/оксид графена	Стабильность биоматериала; механическая прочность электрода; перенос электронов в системе	Глюкозооксидаза/ глюкоза	Ферритин	5.7 мА/см <sup>2</sup>	45 дней	—	Perveen <i>et al.</i> , 2018
УНТ/НЧ Ag	Препятствие денатурации фермента; перенос электронов в системе; устойчивость биоматериала к высокой концентрации H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Глюкозооксидаза/ глюкоза	Без медиатора	0.160 ± 0.0026 мкА/см <sup>2</sup>	5 недель	1.46 ± 0.07 мВт/см <sup>2</sup>	Christwardana <i>et al.</i> , 2018
Восстановленный оксид графена/ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Перенос электронов в системе; высокая удельная поверхность и пористость электрода	Глюкозооксидаза/ глюкоза	Ферритин	32.9 мА/см <sup>2</sup>	45 дней	—	Shakeel <i>et al.</i> , 2019
МУНТ	Перенос электронов в системе	Лактатооксидаза/ лактат в поте	Диметилферроцен	96 мкА	—	13.6 мкВт	Escalona-Villalpando <i>et al.</i> , 2019
НЧ Au	Перенос электронов в системе	Алкогольдегидрогеназа/глицерин	Прямой перенос электронов	510 мА/см <sup>2</sup>	—	130 мкВт/см <sup>2</sup>	Ratautas <i>et al.</i> , 2017
МУНТ	Обеспечение долгосрочной стабильности биоматериала; окисление NADH	Глюкозодегидрогеназа и кофактор NADP/глюкоза	Без медиатора	1300 мА/см <sup>2</sup>	1 год	—	Tahar <i>et al.</i> , 2019

Таблица 2. Окончание

НМ	Роль НЧ	Биоматериал/ топливо	Медиатор	Плотность тока	Время жизни	Мощность	Ссылка
МУНТ	Перенос электронов в системе; увеличение чувствительности БС; снижение общего сопротивления биоэлектродов	<i>Glisopacetobacter systrorfermentas</i> ВКПМ В-11267/ глюкоза	2,6-дихлорофено-линдофенол	-	-	2 мкВт/см <sup>2</sup>	Тарасов и др., 2021
Магнитные НЧ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Облегчение образования биопленок и переноса электронов	<i>Synochococcus</i> sp./ азокраситель Mordant Orange 1	Феррицианид калия	14.04 ± 5.5 А/м <sup>3</sup>	216 ч	4.9 ± 0.5 Вт/м <sup>3</sup>	Sama <i>et al.</i> , 2018
Биогенные НЧ Au и МУНТ	Увеличение количества бактерий на электроде; увеличение генерируемой электроэнергии; уменьшение времени запуска БТЭ	Микробное сообщество активного ила/ глюкоза	Феррицианид в катодном отделении	700 мА/ м <sup>2</sup>	-	178.34 ± 4.79 мВт/см <sup>2</sup>	Wu <i>et al.</i> , 2018
НЧ титана	Перенос электронов в системе; способствуют прикреплению микробов на электроде	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 и <i>Klebsiella pneumoniae</i> L17/ глюкоза	Без медиатора	-	3 недели	97.6 мВт/см <sup>2</sup>	Kim <i>et al.</i> , 2019

и предсказывать возможные механизмы взаимодействия НЧ с мембраной клеток и микроорганизмов (Zhang *et al.*, 2007; Forest, Pourchez, 2017). Например, НЧ серебра, имея отрицательный дзета-потенциал, значительно хуже подавляют пролиферацию клеток, чем НЧ меди, обладающие положительным дзета-потенциалом (Казанцев, 2018). Следует отметить, что исследований по зависимости между свойствами наночастиц, их биологической активностью как анодного/катодного материалов БС и БТЭ и значением дзета-потенциала было выполнено относительно немного.

Свойства НМ влияют на основные характеристики БС и БТЭ. Для БС — это такие аналитические параметры как минимальная определяемая концентрация анализируемого соединения, пределы определения, амплитуда сигнала, чувствительность анализа; для БТЭ — генерируемый потенциал, мощность, и для биоэлектрохимических систем в целом важным параметром является сохранение долговременной стабильности БМ. Рассматривая конкретные НМ, авторы данного обзора обращали внимание именно на эти характеристики модифицированных устройств.

**Углеродные наноматериалы. Углеродные нанотрубки.** К одним из наиболее часто применяемых НМ относят углеродные нанотрубки (УНТ). В 1991 г. японский ученый С. Иджима синтезировал полые молекулы углерода и определил их кристаллическую структуру. Эти молекулы называли углеродными нанотрубками (Iijima, 1991). Обычно углеродные НМ, такие как фуллерен, УНТ, графен (Гр) и их производные, нерастворимы в воде из-за наличия гидрофобной поверхности, в результате чего возникает тенденция к агрегации из-за большой площади поверхности (Алиев и др., 2011). При их модификации, например, неорганическими НЧ золота (Duc Chinh *et al.*, 2019), платины (Kang *et al.*, 2008), серебра (Chen *et al.*, 2012), меди (Lata *et al.*, 2013a), оксида меди (Di Tocco *et al.*, 2018), квантовыми точками (Reza Jamei *et al.*, 2020) создаются новые гибридные конструкции с улучшенной растворимостью и стабильностью.

В работе (Plekhanova *et al.*, 2019) использовали МУНТ, модифицированные хитозаном, в составе микробных биосенсоров. Было показано, что в комбинации с хитозаном УНТ не влияют на структурную целостность и дыхательную активность микробных клеток *Gluconobacter oxydans*. В то же время происходит уменьшение импеданса рабочего электрода более, чем на порядок, увеличивается чувствительность биосенсора к субстратам. Модификация измерительного электрода БС, содержащего филогенетически близкие к бактериям *G. oxydans* клетки *Gluconoacetobacter sucrofermentas* ВКПМ В-11267 с помощью МУНТ также приводило к росту тока в 8–10 раз и к дополнительному

снижению общего сопротивления электрода в ~10 раз (Тарасов и др., 2020).

**Углеродные нановолокна.** Углерод может существовать в форме трубчатых микроструктур, называемых нитями или волокнами. Первые наблюдения углеродных нановолокон (НВ) диаметром 50 нм с помощью электронной микроскопии были выполнены в начале 1950-х гг советскими учеными Радужкевичем и Лукьяновичем (1952). Благодаря своим свойствам НВ широко используются при разработке БС и БТЭ (Yadav *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020). Исследование, посвященное применению углеродного высокодисперсного материала в сочетании с иммобилизованными клетками *G. oxydans* при их сорбционном контакте с углеродными волокнами, представлено в работе (Решетиллов и др., 2017). Исследования показали, что электрическая проводимость в значительной степени зависит от технологии изготовления и химического состава — НВ, не содержащие азот и имеющие пониженное содержание кислорода, оказались наиболее эффективными элементами электродов; максимальная развиваемая удельная мощность составляла 5 мкВт/см<sup>2</sup>.

**Графен и графеноподобные НМ.** Большое внимание исследователи уделяют использованию в БС Гр (Peña-Bahamonde *et al.*, 2018), представляющего двумерную форму углерода и впервые полученного в 2004 г. группой ученых Манчестерского университета и Института проблем технологии микроэлектроники в Черноголовке под руководством А. Гейма и К. Новосёлова (Novoselov *et al.*, 2004). Гр обладает высокой электропроводностью, удовлетворительными механическими и оптическими свойствами, относительно низкой себестоимостью, высокой биосовместимостью (Bai *et al.*, 2020). Применение Гр сопряжено с повышением электрической мощности БТЭ (Bin Mohd Yusoff, 2015). Вопрос об использовании Гр в ферментных и микробных БТЭ, анализ свойств Гр как конкурента углеродных и металлических НМ представлен в обзорном материале (Filip, Tkac, 2014).

В обзорах (Alexander *et al.*, 2020; Arshad *et al.*, 2019) рассматривают, как гидрофобный графен с помощью сурфактантов можно переводить и стабилизировать в растворенном состоянии, получая графеновые наножидкости, сочетающие свойства и графена, и того растворителя, который применяется как базовый.

Перспективными НМ, по сути, близкими к Гр, являются наноуглеродные графеноподобные материалы. К ним относятся терморасширенный графит (ТРГ). При производстве ТРГ исходный кристаллический графит подвергают окислению, а затем высокоскоростному нагреву со скоростью 400–600°C/с, в результате чего графитовые частицы расщепляются практически до графеновых



слоев (Горшенев и др., 2008). В работе (Reshetilov *et al.*, 2015) показано, что применение ТРГ в сочетании с мембранными фракциями (МФ) бактериальных клеток обеспечивает безмедиаторный перенос заряда. Этот эффект обусловлен специфической формой НЧ ТРГ и его взаимодействием с белками МФ. Эффект наблюдали только при окислении этилового спирта, но не глюкозы. Это свидетельствует о том, что при взаимодействии “ТРГ – белки МФ” обеспечивается не только облегченный перенос заряда, но и специальные условия для возникновения своеобразной субстратной специфичности (Решетилов и др., 2016).

Высокоориентированный пиролитический графит (ВОПГ) представляет собой одну из модификаций графита, имеющую слоистую структуру. Материал получается в результате одноосного давления на пироуглерод, прошедший отжиг при высокой температуре (до 3300 К). Структура ВОПГ может быть описана как чередование графеновых плоскостей (Vanerjee *et al.*, 2005). Такая модификация графита также используется как материал электродов для биосенсорных применений (Mahe *et al.*, 2014; Tehrani *et al.*, 2016).

**Наночастицы на основе металлов и их соединений.** Наночастицы металлов, их оксидов и сульфидов широко используются в составе БС и БТЭ. Для их получения обычно используют процесс восстановления солей металлов различными реакционными агентами (Korobeinyuk, *et al.*, 2019; Delbecq *et al.*, 2019). В последнее время для получения металлических НЧ все большее значение приобретают методы биологического синтеза. Такой синтез основан на способности некоторых микроорганизмов создавать различные типы НЧ из материалов-предшественников (Singh *et al.*, 2016; Patil, Kim, 2018). Таким образом открывается перспектива как в области биоремедиации (очистки окружающей среды от загрязняющих соединений, являющимися материалами-предшественниками), так и в области получения НЧ с высокой биосовместимостью. Например, известно биохимическое получение НЧ оксида меди (Waris *et al.*, 2020), железа (Sadhasivam *et al.*, 2020), оксида титана (Jha *et al.*, 2009), золота (Italiano *et al.*, 2018), теллура (Castro *et al.*, 2020), серебра (Nazari, Jookar Kashi, 2020).

При получении НЧ с помощью биологического синтеза возможно встраивание определенных участков генома в используемый микроорганизм для создания нужных НЧ (Pasula, Lim, 2017; Fugubayashi *et al.*, 2020). Кроме того, контролируя pH, температуру, время воздействия и концентрацию исходного раствора солей металла, использование дополнительных химических соединений для увеличения поглощения нужных металлов, можно регулировать скорость образования, размер и

морфологию НЧ (Gericke, Pinches, 2006; Li *et al.*, 2011).

Наиболее часто при создании БС и БТЭ используют НЧ золота (Hua *et al.*, 2021), серебра (Yu *et al.*, 2020), платины (Hossain, Slaughter, 2020), палладия (Guler, Dilmac, 2019), меди (Qing *et al.*, 2019). Из НЧ оксидов металлов наибольшее применение нашли диоксид титана (Shetti *et al.*, 2019a), оксид железа (Chong *et al.*, 2019), оксид церия (Vennila *et al.*, 2018), оксид цинка (Shetti *et al.*, 2019b).

Для обеспечения эффективного переноса электронов от ферментов к электроду часто используют одновременную модификацию полимера для иммобилизации БМ металлическими НЧ и углеродными НМ. Например, композит НЧ диоксида титана с УНТ, функционализированными амином и последующей иммобилизацией глюкозооксидазы, обладает высокой каталитической активностью по отношению к окислению глюкозы (Tasviri *et al.*, 2011); при этом определение глюкозы проводят в отсутствии медиаторов. В работе (Chen *et al.*, 2015) показано, что при использовании смеси, состоящей из гидрофилизированного Гр, который через карбоксильные группы связывали с НЧ золота, скорость переноса электронов в системе увеличивалась, а максимальная мощность устройства достигала значения  $\sim 2$  мВт/см<sup>2</sup>. В работе (Bollella *et al.*, 2018) применили миниатюрную топливную ячейку на ферментной основе; в качестве базовых использовали электроды, полученные матричной печатью, модифицированные НЧ золота и Гр. Основной анода являлась целлобиозодегидрогеназа, основной катода – лакказа. В 100 мкМ растворе глюкозы максимальная плотность энергии составляла  $\sim 1.6$  мкВт/см<sup>2</sup> при напряжении холостого хода 0.6 В.

Применение НМ нередко позволяет решать несколько сопряженных задач – повышения кажущейся каталитической активности электродов (используется терминология “кажущейся”, поскольку активность возрастает не за счет изменения свойств БМ, а возрастает за счет изменения структуры электрода), увеличения времени жизни, эффективного способа иммобилизации. Для БТЭ до сих пор существенной проблемой является низкий энергетический выход и малое время жизни. В работе (Kizling *et al.*, 2020) авторы предлагают конструкцию БТЭ, содержащую каскад ферментов в анодном отделении с целью повысить энергетический выход. Применение НЧ золота для иммобилизации БМ значительно увеличило скорость катализа. Энергетический выход при окислении сахарозы достигал 0.8 мВт/см<sup>2</sup>, что являлось высоким по сравнению с БТЭ с обычным катодом и анодом.

Число новых синтезированных НМ постоянно растет. Сравнительно недавно был синтезирован НМ, который революционизировал многие отрасли науки и техники. Этот высокопроводящий материал с гидрофильной природой, названный максеном (MXene), был открыт в 2011 г. (Naguib *et al.*, 2011). НМ представляет собой двумерные карбиды, нитриды и карбонитриды переходных металлов. Материал перспективен для создания энергетических устройств, особенно гибких электронных устройств, в том числе и БС (Kshetri *et al.*, 2021; Venkateshalu, Grace, 2020). Одна из описанных структур максена, имеющая формулу  $Ti_3C_2T_x$ , позволяла включать в его состав молекулы УНТ, металлы Ag, Cu, Au/Ag, проводящие полимеры (Sarycheva, Gogotsi, 2020). Применение максена в качестве элемента сенсора привело к высокочувствительной детекции пероксида водорода с нижним пределом обнаружения порядка 400 нМ (Logencova *et al.*, 2017, 2018). Включение максена  $Ti_3C_2T_x$  с НЧ платины в состав биосенсора на основе глутаматоксидазы позволило получить высокую чувствительность БС к глутамату (1.59 нА/(мкМ/л)) с нижним пределом обнаружения, равным 0.45 мкМ/л. При этом сигнал биосенсора через 28 дней составлял 70% от первоначального уровня сигнала (Liu *et al.*, 2021).

**Наночастицы неметаллов.** Одним из наиболее перспективных неметаллических НМ является кремний. Применение кремниевых наноструктур в биосенсорах интенсивно развивается (Ji *et al.*, 2018). Это связано, во-первых, с их нетоксичностью: кремниевые НМ легко биоразлагаются и выводятся из организма (Zhong *et al.*, 2015; Chiappini *et al.*, 2015). Во-вторых, такие НЧ обладают настраиваемыми физическими, химическими, оптическими и механическими свойствами (Prabha *et al.*, 2021). В-третьих, НЧ оксида кремния представляют собой сферические везикулы, которые состоят из оболочки из оксида кремния и канюльного ядра, в которое может захватываться большое количество молекул, таких как оксид железа, молекулы органических и неорганических красителей, лекарства. Следовательно, НЧ оксида кремния могут содержать десятки тысяч молекул красителя, что дает значительно более высокий сигнал при использовании их в БС (Wen, 2015). Чаще всего НЧ оксида кремния используют в оптических БС для увеличения чувствительности анализа (Cheng, Guan, 2017). Но известны примеры применения таких НЧ в электрохимических устройствах. Биосенсор, в котором НЧ оксида кремния, функционализированные специфическими поликлональными антителами, использовали для обнаружения *Escherichia coli* в минимальной концентрации  $10^3$  КОЕ/мл, представлен в работе (Mathelié-Guinlet *et al.*, 2019). Основное направление использования кремниевых НМ – биосенсоры на основе кремниевых нано-

проволок (КНП) (Namdari *et al.*, 2016; Puppo *et al.*, 2017). КНП представляют собой класс одномерных НМ, которые были описаны в 2001 г. группой Либера (Cui *et al.*, 2001). Это устройства работают как полевые транзисторы, но благодаря увеличению отношения площади поверхности к объему, они обеспечивают улучшенную аналитическую чувствительность по сравнению с устройствами на планарных полевых транзисторах (Noor, Krull, 2014), например в работе (Duan *et al.*, 2012) была показана возможность обнаружения адсорбции и десорбции белка *in situ* в режиме реального времени без дополнительных меток и с чувствительностью в фемтомолярном диапазоне, а также проводить регистрацию анализируемого соединения на уровне одиночных молекул (Ivanov *et al.*, 2012). Новое поколение биосенсоров на основе наноструктур кремния, начиная от электрохимических датчиков с КНП, полевого транзистора и пористого кремния и заканчивая оптическими датчиками на основе пористого кремния, люминесцентных кремниевых квантовых точек КНП представлено в обзоре (Lenardi *et al.*, 2021).

**Полимерные наноматериалы.** Для сопряжения биологического материала с электродом создаются различные композитные материалы и смеси на основе полимеров. Проводящие полимеры обеспечивают основу для иммобилизации биокатализатора на электроде, одновременно увеличивая проводимость и чувствительность устройства, при чем эти свойства зависят от общей длины цепи полимера, его структуры и состава. Проводящие полимеры могут быть дополнительно модифицированы путем введения различных функциональных групп для связывания белковых молекул. В ряде случаев возможен электрохимический синтез полимера непосредственно на рабочем электроде БС или БТЭ с одновременным захватом биологического материала (Kumar *et al.*, 2020).

Для модификации БС и БТЭ наиболее часто используются такие проводящие полимеры как наноструктурированные полипиррол (Jain *et al.*, 2017), полианилин (Kazemi *et al.*, 2020), политиофен (Ihalainen *et al.*, 2016) и их производные (Rawat, Ghosh, 2020). Следует отметить, что зачастую первые применения проводящих полимеров связаны не с БС и БТЭ. Например, такой высокопроводящий полимер как поли(3,4-этилендиокситиофен) полистиролсульфонат (ПЭДОТ:ПСС), обладающий высокой механической гибкостью, растяжимостью и оптической прозрачностью начал применяться в термоэлектрических генераторах; в качестве антистатического агента при производстве фотопленок; как электролит в полимерных электролитических конденсаторах; для изготовления фотоэлектрических элементов, дисплеев и транзисторов и т.п. (Fan *et al.*, 2019). Это производное политиофена было синтезировано во второй половине 1980-х годов учеными из Германии (Jonas

*et al.*, 1988) и только спустя десять лет начали появляться первые работы по применению этого полимера в биосенсорах (Groenendaal *et al.*, 2000).

Одно из направлений связано с развитием гиперразветвленных полимеров наноразмеров – дендримеров (Golshan *et al.*, 2020; Rabiee *et al.*, 2020). Это монодисперсные трехмерные сверхразветвленные наноразмерные полимерные архитектуры с очень высокой плотностью поверхностных функциональных групп (Евтюгин, Стойкова, 2015). Они содержат периферийные группы  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{CHO}$ , с помощью которых их можно конъюгировать с БМ, при этом разветвленная структура оказывает стабилизирующее действие на трехмерную структуру белков и нуклеиновых кислот. Дендримеры синтезируются серийно повторяющихся шагов. Идея повторяющегося роста с ветвлением впервые была высказана Фогтлем (Vogtle *et al.*, 1978). Термин “дендример” ввел Д. А. Томалиа на первой международной конференции по полимерам, проходившей в Японии в августе 1984 г. (Tomalia *et al.*, 1984) и подробно описал синтез дендримера поли(амидо-амина) (Tomalia *et al.*, 1985). Использование дендримеров предоставляет возможность изучения переноса заряда (выявления роли структурных и стерических факторов) в поверхностном слое электрода. Имобилизация фермента уреазы на самоорганизованных дендримерах из МУНТ с полиамидоамином (Dervisevic *et al.*, 2018) позволила создать БС с широким линейным диапазоном обнаружения мочевины 1–20 мМ, низким пределом обнаружения 0.4 мМ и высокой чувствительностью  $\sim 7$  нА/мМ; время анализа составляло 3 с.

**Квантовые точки.** Квантовые точки (КТ) представляют собой полупроводниковые нанокристаллы с размером порядка 2–10 нм, состоящие из атомов, созданных на основе неорганических полупроводниковых материалов Si, InP, CdSe и т.д., покрытые монослоем стабилизатора из органических молекул (Олейников, 2010; Aladesuyi, Oluwafemi, 2020). Квантовые точки были впервые получены в 1981г. Алексеем Екимовым для сульфида кадмия в стеклянной матрице (Екимов, Онущенко, 1981), а затем, в 1985 г., Луисом Брюсом в коллоидных растворах (Brus, 1984). Основное преимущество КТ заключается в возможности высокоточного контроля над их размерами, а, следовательно, и над их электрическими характеристиками (Walther *et al.*, 2020), что делает их перспективными при создании БС (Azizi *et al.*, 2020; Fatima *et al.*, 2020) и БТЭ (Talooki *et al.*, 2020). В работе (Wu *et al.*, 2017) использовали КТ для имобилизации на аноде  $\text{НАД}^+$  – зависимых алкогольдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы и формилатдегидрогеназы, а на катоде – лакказы; КТ обеспечивали высокую электропроводность меж-

ду ферментами и базовым стеклоуглеродным электродом. При восстановлении кислорода наблюдали эффект прямого переноса заряда. Указанная конструкция развивала максимальную мощность  $\sim 69$  мкВт/см<sup>2</sup> при потенциале холостого хода в 0.7 В. Биосенсор на основе КТ нитрида бора был применен для анализа сердечного тропонина-I (одна из субъединиц сердечных тропониновых комплексов, являющихся биохимическим маркером острого инфаркта миокарда) в плазме крови (Yola, Atar, 2018). Применение КТ позволило добиться нижнего предела обнаружения в 0.0005 нг/мл (концентрация тропонина I в крови у человека со здоровым сердцем не превышает 0.026 нг/мл), что дало возможность проводить раннюю диагностику инфаркта миокарда с высокой точностью.

### ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ НАНОМАТЕРИАЛОВ И МЕХАНИЗМ ИХ ДЕЙСТВИЯ

Как видно из приведенных выше данных, для применения в биоэлектрохимических устройствах НМ модифицируют, создавая композиции с измененными свойствами. Следует отметить, что есть множество работ, показывающих токсическое воздействие НМ на живые объекты (Mohanta *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019; Caixeta *et al.*, 2020; Yin *et al.*, 2020). Некоторые НМ благодаря своей физической природе способны индуцировать активные формы кислорода (Long *et al.*, 2007; Kang, 2008). Другие НМ способны проникать через тканевые барьеры внутрь клеток и взаимодействовать с внутриклеточными компонентами (Kaur *et al.*, 2008). Известен также эффект нарушения мембранных структур за счет влияния НМ на их проницаемость (Hong *et al.*, 2004). С помощью функционализации токсичность НМ можно изменять. Например, в процессе окисления УНТ на концах трубок образуются карбоксильные группы, что делает их гидрофильными и, следовательно, растворимыми в водных растворителях при наблюдаемом снижении токсичности НМ (Mallakpou, Soltanian, 2016). Функционализация небольшими молекулами (“обертывание” полимерами) может изменять электрохимические свойства НМ (Zhao, Stoddart, 2009), улучшать его механические свойства (Zhang, Huang, 2016). При химической функционализации УНТ появляется возможность образования связей с БМ (Verma *et al.*, 2013; Christwardana *et al.*, 2017). Модификация, например, хитозаном, позволяет снизить токсичность УНТ и увеличить их растворимость в воде (Negm *et al.*, 2020).

Металлические НЧ применяют для функционализации УНТ, либо УНТ используют для функционализации НЧ металлов с целью дальнейшей имобилизации на таких структурах БМ (Lahsen *et al.*, 2020). Например, имобилизацию перокси-

дазы хрена с помощью 3-аминопропилтриэтоксилана на композитах  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{УНТ}$  применили для эффективной деградации фенола в сточных водах (Zhang, Cai, 2018). В работе (Asghary *et al.*, 2019) для решения проблемы токсичности УНТ микроорганизмы связывали с ними через НЧ золота (использовали сообщество бактерий из бытовых сточных вод).

Несомненно, что применение НМ становится более эффективным при понимании механизма их действия. В главном, интегральном, моменте эффекты НМ основаны на снижении электрического сопротивления – увеличении проводимости рецепторного материала; под рецепторным материалом подразумевается сложная композиция, включающая БМ, НЧ, полимерные компоненты, медиаторы, проводящий электролит, расположенные на поверхности рабочего электрода.

Молекулярная детализация сути процесса переноса заряда может быть различна, однако в итоге все определяется взаимным расположением активного центра фермента (выделенного или находящегося в составе микробной клетки), расстоянием до ближайшей точки на НМ, позволяющей передавать/принимать заряды (обеспечивать прохождение тока), геометрий расположения частиц НМ, присутствием проводящего электролита. Так, например, в работе (Арляпов и др., 2020) предполагается, что перенос заряда может происходить по двум механизмам – по сетке, образуемой НМ, если медиатор отсутствует, либо по прыжковому механизму – смешанному пути по структурам “медиатор – НМ”. НМ служит переносчиком, обеспечивающим ускоренный перенос заряда. В случае, если расстояние между ковалентно-связанными медиаторами большое, то скорость прыжковой составляющей переноса электронов может снижаться. За счет внедрения УНТ в структуру редокс-активного полимера эффективное расстояние между молекулами медиаторов уменьшается; УНТ играют роль мостиков, по которым электроны переносятся по редокс-активному полимеру на электрод. Детальный анализ возможных механизмов переноса заряда в системе, использующей НМ, представлен в работе (Adachi *et al.*, 2020).

\* \* \*

Таким образом, можно отметить, что применение НМ позволяет значительно увеличить точность и чувствительность анализа, а во многих случаях увеличить скорость получения результатов. Также применение НМ приводит к уменьшению объема образцов, необходимых для проведения анализа, т.к. появляется возможность получения сигнала, связанного с одной молекулой, с одной клеткой. Развитие гибких и биосовместимых материалов на основе НМ позволяет разрабатывать носимые и имплантируемые устрой-

ства. При этом точность и воспроизводимость таких устройств уже не просто не сопоставима, а значительно превышает традиционные методы анализа. Кроме того, применение НМ позволяет значительно уменьшить величину измеряющего устройства, дает возможность проводить измерения в сложных матрицах с минимальной пробоподготовкой, на месте сбора образца.

Можно предположить, что следующее поколение биосенсоров будет использовать новые биорецепторы во взаимосвязи с новыми классами НМ еще более интенсивно, чем в настоящее время. Основное направление развития БС и БТЭ связано с оптимизацией стратегии связывания биоматериалов с поверхностью преобразователя, представленного НМ, с интеграцией массива биосенсоров на одной платформе для одновременного анализа различных анализируемых соединений. Для такого развития требуется одновременное участие в исследованиях специалистов различных областей знаний – биологов, химиков, врачей, инженеров, специалистов микроэлектронного профиля, что должно приводить к интегрированным междисциплинарным исследовательским программам.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта (20-13-50157).

**Acknowledgments.** The reported study was funded by RFBR, project number 20-13-50157.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алиев А.Д., Бойнович Л.Б., Буховец В.Л., Емельяненко А.М., Горбунов А.М., Городецкий А.Е., Пашинин А.С. Супергидрофобные покрытия на основе нанотрубок нитрида бора: механизм супергидрофобности и самовосстановление высокогидрофобных свойств // Российские нанотехнологии. 2011. Т. 6. № 11–12. С. 57–64.
- Арляпов В.А., Харьковова А.С., Абрамова Т.Н., Кузнецова Л.С., Илюхина А.С., Зайцев М.Г., Решетиллов А.Н. Гибридный редокс-активный полимер на основе бычьего сывороточного альбумина, ферроцена, карбоксилированных углеродных нанотрубок и глюкозооксидазы // Журн. аналит. химии. 2020. Т. 75(9). С. 820–833.
- Горшенев В.Н., Илюшин А.С., Колесов В.В., Фионов А.С., Петрова Н.Г. Композиционные материалы на основе терморасширенного графита // Перспективные материалы. 2008. Т. 6. № 2. С. 351–355.
- Евтюгин Г.А., Стойкова Е.Е. Электрохимические биосенсоры на основе дендримеров // Журн. аналит. химии. 2015. Т. 70. № 5. С. 451–469.
- Екимов А.И., Онущенко А.А. Квантовый размерный эффект в трехмерных микрокристаллах полупроводников // Письма в журн. эксперим. и теорет. физики. 1981. Т. 34. С. 363–366.
- Казанцев С.О., Фоменко А.Н., Кондратова А.Н. Электрохимические свойства биметаллических наночастиц с различным соотношением металлов //

- Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XIX Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва, г. Томск, Изд-во ТПУ, 2018. С. 77–78.
- Олейников В.А. Квантовые точки в биологии и медицине // Природа. 2010. № 3. С. 22–28.
- Радушкевич Л.В., Лукьянович В.М. О структуре углерода, образующегося при термическом разложении окиси углерода на железном контакте // Журн. физ. химии. 1952. № 26. С. 88–95.
- Решетиллов А.Н., Китова А.Е., Мачулин А.В., Тарасов С.Е., Гуторов М.А., Алферов С.В., Колесов В.В., Готовцев П.М., Василов Р.Г. Биосенсор на основе клеток *Glucanobacter* и терморасширенного графита // Сенсорные системы. 2016. Т. 30. № 4. С. 351–354.
- Решетиллов А.Н., Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Быков А.Г., Гуторов М.А., Алферов С.В., Тенчурун Т.Х., Чвалун С.Н., Орехов А.С., Шепелев А.Д., Готовцев П.М., Василов Р.Г. Оценка свойств биоэлектродов на основе углеродных высокодисперсных материалов, содержащих модельные микроорганизмы *Glucanobacter* // Российские нанотехнологии. 2017. Т. 12. № 1–2. С. 83–89.
- Решетиллов А.Н., Готовцев П.М., Сандраморти А.К., Василов Р.Г. Биосенсоры – движение от макро- к микро- и наноразмерам // Российские нанотехнологии. 2020. Т. 15. № 1. С. 14–21.
- Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Быков А.Е., Кленова Н.А., Решетиллов А.Н. Стимулирующие эффекты мультистенных углеродных нанотрубок на иммобилизованные бактериальные клетки *Glucanacetobacter sucrofermentans* ВКПМ В-11267 // Российские нанотехнологии. 2020. Т. 15. № 1. С. 86–89.
- Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Быков А.Г., Казаков А.С., Вишневская М.В., Парунова Ю.М., Готовцев П.М., Решетиллов А.Н. Перспективы использования *Glucanacetobacter sucrofermentans* ВКПМ В-11267 в биотопливных элементах // Приклад. биохимия и микробиол. 2021. Т. 57. № 2. С. 187–195.
- Adachi T., Kitazumi Y., Shirai O., Kano K. Direct electron transfer-type bioelectrocatalysis of redox enzymes at nanostructured electrodes // Catalysts. 2020. V. 10(2). P. 236.
- Aladesuyi O.A., Oluwafemi O.S. Synthesis strategies and application of ternary quantum dots - in cancer therapy // Nano-Struct. Nano-Objects. 2020. V. 24. e.100568.
- Alexander K., Sheshrao Gajghate S., Shankar Katarkar A., Majumder A., Bhaumik S. Role of nanomaterials and surfactants for the preparation of graphene nanofluid: a review // Mater. Today: Proc. 2020. V. 44(1). P. 1136–1143.
- Andoralov V., Falk M., Suyatin D.B., Granmo M., Sotres J., Ludwig R., Popov V.O., Schouenborg J., Blum Z., Shleev S. Biofuel cell based on microscale nanostructured electrodes with inductive coupling to rat brain neurons // Sci. Rep. 2013. V. 3(1). 3270. <https://doi.org/10.1038/srep03270>
- Arora B., Attri P. Carbon Nanotubes (CNTs): a potential nanomaterial for water purification // J. Compos. Sci. 2020. V. 4(3). P. 135.
- Arshad A., Jabbar M., Yan Y., Reay D. A review on graphene based nanofluids: preparation, characterization and applications // J. Mol. Liq. 2019. V. 279. P. 444–484.
- Asghary M., Raoof J.B., Rahimnejad M., Ojani R. Usage of gold nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes-modified CPE as a nano-bioanode for enhanced power and current generation in microbial fuel cell // J. Iran. Chem. Soc. 2019. V. 16. P. 1677–1685. <https://doi.org/10.1007/s13738-019-01645-y>
- Asha A.B., Narain R. Nanomaterials properties / Ed. Narain R. Polymer Science and Nanotechnology. Fundamentals and Applications, Elsevier Inc. 2020. P. 343–359. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816806-6.00015-7>
- Azizi S., Gholivand M.-B., Amiri M., Manouchehri I. DNA biosensor based on surface modification of ITO by physical vapor deposition of gold and carbon quantum dots modified with neutral red as an electrochemical redox probe // Microchem. J. 2020. V. 159. e.105523.
- Bagyalakshmi S., Sivakami A., Balamurugan K.S. A ZnO nanorods based enzymatic glucose biosensor by immobilization of glucose oxidase on a chitosan film // Obes. Med. 2020. V. 18. e.100229.
- Bai Y., Xu T., Zhang X. Graphene-based biosensors for detection of biomarkers // Micromachines (Basel). 2020. V. 11(1). e.60.
- Banerjee S., Sardar M., Gayathri N., Tyagi A.K., Raj B. Conductivity landscape of highly oriented pyrolytic graphite surfaces containing ribbons and edges // Phys. Rev. B. 2005. V. 72(7). e.075418.
- Bin Mohd Yusoff A.R. Applications of Graphene and Its Derivative in Enzymatic Biofuel Cells / Ed. A. Rashid Bin Mohd Yusoff: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2015. P. 371–378.
- Bollella P., Fusco G., Stevar D., Gorton L., Ludwig R., Ma S., Boer H., Koivula A., Tortolini C., Favero G., Antiochia R., Mazzei F. A Glucose/oxygen enzymatic fuel cell based on gold nanoparticles modified graphene screen-printed electrode. proof-of-concept in human saliva // Sens. Actuators, B. 2018. V. 256. P. 921–930.
- Brus L.E. Electron–electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state // J. Chem. Phys. 1984. V. 80(9). P. 4403–4409.
- Caixeta M.B., Araújo P.S., Gonçalves B.B., Silva L.D., Grano-Maldonado M.I., Rocha T.L. Toxicity of engineered nanomaterials to aquatic and land snails: a scientometric and systematic review // Chemosphere. 2020. V. 260. e.127654.
- Cao L., Kiely J., Piano M., Luxton R. Nanoparticle-based 3D membrane for impedimetric biosensor applications // Bioelectrochemistry. 2020. V. 136. e.107593.
- Castro L., Li J., González F., Muñoz J.A., Blázquez M.L. Green synthesis of tellurium nanoparticles by tellurate and tellurite reduction using *Aeromonas hydrophila* under different aeration conditions // Hydrometallurgy. 2020. V. 196. e.105415.
- Chen L., Xie H., Li J. Electrochemical glucose biosensor based on silver nanoparticles/multiwalled carbon nanotubes modified electrode // J. Solid State Electrochem. 2012. V. 16(10). P. 3323–3329.

- Chen Y., Gai P., Zhang J., Zhu J.-J. Design of an enzymatic biofuel cell with large power output // *J. Mater. Chem. A*. 2015. V. 3(21). P. 11511–11516.
- Cheng X., Guan B. Optical biosensing and bioimaging with porous silicon and silicon quantum dots (invited review) // *Prog. Electromag. Res.* 2017. V. 160. P. 103–121.  
<https://doi.org/10.2528/pier17120504>
- Chiappini C., De Rosa E., Martinez J.O., Liu X., Steele J., Stevens M.M., Tasciotti E. Biodegradable silicon nanoneedles delivering nucleic acids intracellularly induce localized *in vivo* neovascularization // *Nat. Mater.* 2015. V. 14(5). P. 532–539.  
<https://doi.org/10.1038/nmat4249>
- Chong S.F., Razak K.A., Nor N.M., Ridhuan N.S., Zakaria N.D. Electrochemical Glucose Detection using Screen-Printed Carbon Electrode Modified Silica-Encapsulated Iron Oxide Nanoparticles // *Materials Today: Proceedings*. 2019. V. 17. P. 1189–1196  
<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.06.562>
- Christwardana M., Chung Y., Kwon Y. A new biocatalyst employing pyrenecarboxaldehyde as an anodic catalyst for enhancing the performance and stability of an enzymatic biofuel cell // *NPG Asia Materials*. 2017. V. 9(6). e386.
- Christwardana M., Kim D.-H., Chung Y., Kwon Y. A hybrid biocatalyst consisting of silver nanoparticle and naphthalenethiol self-assembled monolayer prepared for anchoring glucose oxidase and its use for an enzymatic biofuel cell // *Appl. Surf. Sci.* 2018. V. 429. P. 180–186.
- Cui H.-F., Zhang T.-T., Lv Q.-Y., Song X., Zhai X.-J., Wang G.-G. An acetylcholinesterase biosensor based on doping Au nanorod@SiO<sub>2</sub> nanoparticles into TiO<sub>2</sub>-chitosan hydrogel for detection of organophosphate pesticides // *Biosens. Bioelectron.* 2019. V. 141. e.111452.
- Cui Y., Wei Q., Park H., Lieber C.M. Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species // *Science*. 2001. V. 293(5533). P. 1289–1292.  
<https://doi.org/10.1126/science.1062711>
- Dagar K., Pundir C.S. An improved amperometric L-lactate biosensor based on covalent immobilization of microbial lactate oxidase onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes/copper nanoparticles/polyaniline modified pencil graphite electrode // *Enzyme Microb. Technol.* 2017. V. 96. P. 177–186.
- Delbecq F., Delfosse P., Laboueix G., Paré C., Kawai T. Study of a gelated Deep Eutectic solvent metal salt solution as template for the production of size-controlled small noble metal nanoparticles // *Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Asp.* 2019. V. 567. P. 55–62.
- Dervisevic M., Dervisevic E., Šenel M. Design of amperometric urea biosensor based on self-assembled monolayer of cystamine/PAMAM-grafted MWCNT/Urease // *Sens. Actuators, B: Chem.* 2018. V. 254. P. 93–101.
- Di Tocco A., Robledo S.N., Osuna Y., Sandoval-Cortez J., Granero A.M., Vettorazzi N.R., Martinez J.L., Segura E.P., Iliina A., Zon M.A., Arevalo F.J., Fernández H. Development of an electrochemical biosensor for the determination of triglycerides in serum samples based on a lipase/magnetite-chitosan/copper oxide nanoparticles/multiwalled carbon nanotubes/pectin composite // *Talanta*. 2018. V. 190. P. 30–37.
- Duan X., Li Y., Rajan N.K., Routenberg D.A., Modis Y., Reed M.A. Quantification of the affinities and kinetics of protein interactions using silicon nanowire biosensors // *Nature Nanotech.* 2012. V. 7. P. 401–407.
- Duc Chinh V., Speranza G., Migliaresi C., Van Chuc N., Minh Tan V., Phuong N.-T. Synthesis of gold nanoparticles decorated with multiwalled carbon nanotubes (Au-MWCNTs) via cysteaminium chloride functionalization // *Sci. Rep.* 2019. V. 9(1). P. 5667.
- El Ichi-Ribault S., Alcaraz J.-P., Boucher F., Boutaud B., Dalmolin R., Boutonnat J., Cinquin P., Zebda A., Martin D.K. Remote wireless control of an enzymatic biofuel cell implanted in a rabbit for 2 months // *Electrochim. Acta*. 2018. V. 269. P. 360–366.
- Escalona-Villalpando R.A., Ortiz-Ortega E., Bocanegra-Ugalde J.P., Minter S.D., Arriaga L.G., Ledesma-García J. A complete tattoo-based wireless biofuel cell using lactate directly from sweat as fuel // *J. Phys. Conf. Ser.* 2019. V. 1407. e.012028.
- Falk M., Andoralov V., Silow M., Toscano M.D., Shleev S. Miniature biofuel cell as a potential power source for glucose-sensing contact lenses // *Anal. Chem.* 2013. V. 85(13). P. 6342–6348.
- Fan X., Nie W., Tsai H., Wang N., Huang H., Cheng Y., Wen R., Ma L., Yan F., Xia Y. PEDOT: PSS for flexible and stretchable electronics: modifications, strategies, and applications // *Adv. Sci.* 2019. e.1900813.
- Fatima B., Hussain D., Bashir S., Hussain H.T., Aslam R., Nawaz R., Rashid H.N., Bashir N., Majeed S., Ashiq M.N., Najam-ul-Haq M. Catalase immobilized Antimonene quantum dots used as an electrochemical biosensor for quantitative determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from CA-125 diagnosed ovarian cancer samples // *Mater. Sci. Eng., C*. 2020. e.111296.
- Filip J., Tkac J. Is graphene worth using in biofuel cells? // *Electrochim. Acta*. 2014. V. 136. P. 340–354.
- Forest V., Pourchez J. Preferential binding of positive nanoparticles on cell membranes is due to electrostatic interactions: A too simplistic explanation that does not take into account the nanoparticle protein corona // *Mater. Sci. Eng. C*. 2017. V. 70. P. 889–896.  
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.016>
- Furubayashi M., Wallace A.K., González L.M., Jahnke J.P., Hanrahan B.M., Payne A.L., Stratis-Cullum D.N., Gray M.T., Liu H., Rhoads M.K., Voigt C.A. Genetic tuning of iron oxide nanoparticle size, shape, and surface properties in *Magnetospirillum magneticum* // *Adv. Funct. Mater.* 2020. e.2004813.
- Gericke M., Pinches A. Biological synthesis of metal nanoparticles // *Hydrometallurgy*. 2006. V. 83. № 1–4. P. 132–140.
- Golshan M., Rostami-Tapeh-Esmail E., Salami-Kalajahi M., Roghani-Mamaqani H. A review on synthesis, photophysical properties, and applications of dendrimers with perylene core // *Eur. Polym. J.* 2020. V. 137. e.109933.
- Gonzalez-Solino C., Lorenzo M. Enzymatic fuel cells: towards self-powered implantable and wearable diagnostics // *Biosensors*. 2018. V. 8(1). P. 11.
- Groenendaal L., Jonas F., Freitag D., Pielartzik H., Reynolds J.R. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and its derivatives:

- past, present, and future // *Adv. Mater.* 2000. V. 12(7). P. 481–494.
- Guler M., Dilmac Y.* Palladium nanoparticles decorated (3-aminopropyl)triethoxysilane functionalized reduced graphene oxide for electrochemical determination of glucose and hydrogen peroxide // *J. Electroanal. Chem.* 2019. V. 834. P. 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.12.052>
- He B., Liu H.* Electrochemical biosensor based on pyruvate oxidase immobilized AuNRs@Cu<sub>2</sub>O-NDs as electroactive probes loaded poly (diallyldimethylammonium chloride) functionalized graphene for the detection of phosphate // *Sens. Actuator B-Chem.* 2020. V. 304. e.27303.
- Hong S., Bielinska A.U., Mecke A., Keszler B., Beals J.L., Shi X., Balogh L., Orr B.J., Baker J.B., Banaszak M.M.* Interaction of poly(amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayers and cells: hole formation and the relation to transport // *Bioconjug. Chem.* 2004. V. 15. № 4. P. 774–782.
- Hossain M.F., Slaughter G.* PtNPs decorated chemically derived graphene and carbon nanotubes for sensitive and selective glucose biosensing // *J. Electroanal. Chem.* 2020. V. 861. e.113990. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.113990>
- Hua Z., Yu T., Liu D., Xianyu Y.* Recent advances in gold nanoparticles-based biosensors for food safety detection // *Biosens. Bioelectron.* 2021. V. 179. e.13076.
- Hwang H.S., Jeong J.W., Kim Y.A., Chang M.* Carbon nanomaterials as versatile platforms for biosensing applications // *Micromachines.* 2020. V. 11(9). 814.
- Ihalainen P., Pesonen M., Sund P., Viitala T., Määttänen A., Sarfraz, J., Wilén C.-E., Österbacka R., Peltonen J.* Printed biotin-functionalised polythiophene films as biorecognition layers in the development of paper-based biosensors // *Appl. Surf. Sci.* 2016. V. 364. P. 477–483.
- Iijima S.* Helical microtubules of graphitic carbon // *Nature.* 1991. V. 354(6348). P. 56–58.
- Italiano F., Agostiano A., Belviso B.D., Caliendo R., Carrozzini B., Comparelli R., Melillo M.T., Mesto E., Tempesta G., Trotta M.* Interaction between the photosynthetic anoxygenic microorganism *Rhodospirillum rubrum* and soluble gold compounds. From toxicity to gold nanoparticle synthesis // *Colloids Surf., B.* 2018. V. 172. P. 362–371.
- Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Kozlov A.F., Malsagova K.A., Krohin N.V., Shumyantseva V.V., Shumov I.D., Popov V.P., Archakov A.I., Naumova O.V., Fomin B.I., Nasimov D.A., Aseev A.L.* SOI nanowire for the high-sensitive detection of HBSAg and  $\alpha$ -fetoprotein // *Lab on a Chip: Miniaturisation for Chemistry and Biology.* 2012. V. 12(23). P. 5104–5111.
- Jain R., Jadon N., Pawaiya A.* Polypyrrole based next generation electrochemical sensors and biosensors: a review // *TrAC.* 2017. V. 97. P. 363–373. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.009>
- Jha A.K., Prasad K., Kulkarni A.R.* Synthesis of TiO<sub>2</sub> nanoparticles using microorganisms // *Colloids Surf., B.* 2009. V. 71(2). P. 226–229.
- Ji X., Wang H., Song B., Chu B., He Y.* Silicon nanomaterials for biosensing and bioimaging analysis // *Front. Chem.* 2018. V. 6. 38.
- Jonas F., Heywang G., Schmidberg W., Heinze J., Dietrich M. (Bayer AG),* European Patent, 339–340, 1988.
- Kang S.J.* Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes // *Environ. Mol. Mutagen.* 2008. V. 49. № 5. P. 399–405.
- Kang X., Mai Z., Zou X., Cai P., Mo J.* Glucose biosensors based on platinum nanoparticles-deposited carbon nanotubes in sol–gel chitosan/silica hybrid // *Talanta.* 2008. V. 74(4). P. 879–886.
- Kaur R., Rana S., Lalit K., Singh P., Kaur K.* Electrochemical detection of methyl parathion via a novel biosensor tailored on highly biocompatible electrochemically reduced graphene oxide-chitosan-hemoglobin coatings // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 167. e.112486.
- Kaura I.P., Bhanarib R., Bhanarib S., Kakkara V.* Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting // *J. Controlled Release.* 2008. V. 127. № 2. P. 97–109.
- Kazemi F., Naghib S.M., Mohammadpour Z.* Multifunctional micro-/nanoscaled structures based on polyaniline: an overview of modern emerging devices // *Mater. Today Chem.* 2020. V. 16. e.100249.
- Khan I., Saeed K., Khan I.* Nanoparticles: properties, applications and toxicities // *Arab. J. Chem.* 2019. V. 12. P. 908–931.
- Kilele J.C., Chokkareddy R., Rono N., Redhi G.G.* A novel electrochemical sensor for selective determination of theophylline in pharmaceutical formulations // *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 2020. V. 111. P. 228–238.
- Kim C., Kim J.R., Heo J.* Enhancement of bioelectricity generation by a microbial fuel cell using Ti nanoparticle modified carbon electrode // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2019. V. 94. P. 1622–1627.
- Kizling M., Dzwonek M., Nowak A., Tymecki Ł., Stolarczyk K., Więckowska A., Bilewicz R.* Multi-substrate biofuel cell utilizing glucose, fructose and sucrose as the anode fuels // *Nanomaterials.* 2020. V. 10(8). e.1534.
- Korobeinyk A.V., Whitby R.D.L., Mikhalovsky S.V., Inglezakis V.J.* In situ production of high purity noble metal nanoparticles on fumed silica and catalytic activity towards 2-nitrophenol reduction // *J. Phys. Chem. Solids.* 2019. V. 127. P. 28–34.
- Kshetri T., Tran D.T., Le H.T., Nguyen D.C., Hoa V.H., Kim N.H., Lee J.H.* Recent Advances in MXene-based nanocomposites for electrochemical energy storage applications // *Prog. Mater. Sci.* 2021. V. 117. e.100733.
- Kucherenko I., Soldatkin A., Kucherenko D., Soldatkina O., Dzyadevych S.V.* Advances in nanomaterial application in enzyme-based electrochemical biosensors: a review // *Nanoscale Advances.* 2019. V. 1. e.4560.
- Kumar A., Sharma S., Pandey L.M., Chandra P.* Nanoengineered material based biosensing electrodes for enzymatic biofuel cells applications // *Materials Science for Energy Technologies.* 2018. V. 1(1). P. 38–48.
- Kumar H., Kumari N., Sharma R.* Nanocomposites (conducting polymer and nanoparticles) based electrochemical biosensor for the detection of environment pollutant: its issues and challenges // *Environ. Impact Assess Rev.* 2020. V. 85. e.106438. <https://doi.org/10.1016/j.eiar.2020.106438>
- Kumar T.H.V., Sundramoorthy A.K.* Electrochemical biosensor for methyl parathion based on single-walled carbon nanotube/glutaraldehyde crosslinked acetylcho-



- linesterase-wrapped bovine serum albumin nanocomposites // *Anal. Chim. Acta*. 2019. V. 1074. P. 131–141.
- Lahcen A.A., Rauf S., Beduk T., Durmus C., Aljedaibi A., Timur, S., Alshreef H.N., Amine A., Wolfbeis O.S., Salama K.N. Electrochemical sensors and biosensors using laser-derived graphene: a comprehensive review // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 168. e.112565.
- Lata S., Batra B., Kumar P., Pundir C.S. Construction of an amperometric d-amino acid biosensor based on d-amino acid oxidase/carboxylated multiwalled carbon nanotube/copper nanoparticles/polyaluminum modified gold electrode // *Anal. Biochem.* 2013a. V. 437(1). P. 1–9.
- Lata S., Batra B., Singala N., Pundir C.S. Construction of amperometric l-amino acid biosensor based on l-amino acid oxidase immobilized onto ZnONPs/c-MWCNT/PANI/AuE // *Sens. Actuator B-Chem.* 2013b. V. 188. P. 1080–1088.
- Lee M.-K., Lee Y.J., Kang J.Y., Lee S.H. Strong enzyme immobilization associated by anatase TiO<sub>2</sub> sputtered on platinum black nanoclusters to improve sensitivity and long-term stability of electrochemical cholesterol sensor // *Sens. Actuator B-Chem.* 2021. V. 334. e.129617.
- Lenardi A.A., Faro M.J.L., Irrere A. Biosensing platforms based on silicon nanostructures: A critical review // *Anal. Chim. Acta*. 2021. V. 1160. 338393.
- Li X., Xu H., Chen Z.-S., Chen G. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications // *J. Nanomater.* 2011. V. 2011. P. 1–16.
- Liu J., Fan Y., Chen G., Liu Y. Highly sensitive glutamate biosensor based on platinum nanoparticles decorated MXene-Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub> for l-glutamate determination in food-stuffs // *Food Sci. Technol.* 2021. V. 148. e.111748.
- Long T.C., Tajuba J., Sama P., Saleh N., Swartz C., Parker J., Hester S., Lowry G.V., Veronesi B. Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons *in vitro* // *Environ. Health. Perspect.* 2007. V. 115(11). P. 1631–1637.
- Lorencova L., Bertok T., Dosekova E., Holazova A., Paprckova D., Vikartovska A., Sasinkova V., Filip J., Kasak P., Jerigova M., Velic D., Mahmoud K.A., Tkac J. Electrochemical performance of Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub> MXene in aqueous media: towards ultrasensitive H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing // *Electrochim. Acta*. 2017. V. 235. P. 471–479.
- Lorencova L., Bertok T., Filip J., Jerigova M., Velic D., Kasak P., Mahmoud K.A., Tkac J. Highly stable Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub> (MXene)/Pt nanoparticles-modified glassy carbon electrode for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and small molecules sensing applications // *Sens. Actuators, B*. 2018. V. 263. P. 360–368.
- Mahe L.S.A., Green S.J., Winlove C.P., Jenkins A.T.A. Pyrene-wired antibodies on highly oriented pyrolytic graphite as a label-free impedance biosensor for the sepsis biomarker procalcitonin // *J. Solid State Electrochem.* 2014. V. 18(12). P. 3245–3249.
- Mallakpour S., Soltanian S. Surface functionalization of carbon nanotubes: fabrication and applications // *RSC Advances*. 2016. V. 6(111). P. 109916–109935.
- Mathelié-Guinlet M., Cohen-Bouhacina T., Gammoudi I., Martin A., Béven L., Delville M.-H., Grauby-Heywang C. Silica nanoparticles-assisted electrochemical biosensor for the rapid, sensitive and specific detection of *Escherichia coli* // *Sens. Actuators B Chem.* 2019. V. 292. P. 314–320.
- Miernicki M., Hofmann T., Eisenberger I., von der Kammer F., Praetorius A. Legal and practical challenges in classifying nanomaterials according to regulatory definitions // *Nat. Nanotechnol.* 2019. V. 14. P. 208–216.
- Mohanta D., Patnaik S., Sood S., Das N. Carbon nanotubes: evaluation of toxicity at biointerfaces // *J. Pharm. Anal.* 2019. V. 9. P. 293–300.
- Mohtar L., Aranda P., Messina G.A., Nazareno M.A., Pereira S.V., Raba J., Bertolino F.A. Amperometric biosensor based on laccase immobilized onto a nanostructured screen-printed electrode for determination of polyphenols in propolis // *Microchem. J.* 2019. V. 144. P. 13–18.
- Naguib M., Kurtoglu M., Presser V., Lu J., Niu J., Heon M., Hultman Y., Barsoum M.W. Two-dimensional nanocrystals produced by exfoliation of Ti<sub>3</sub>AlC<sub>2</sub> // *Adv. Mater.* 2011. V. 23(37). P. 4248–4253.
- Namdari P., Daraee H., Eatemadi A. Recent advances in silicon nanowire biosensors: synthesis methods, properties, and applications // *Nanoscale Res. Lett.* 2016. V. 11(1). e.406.  
<https://doi.org/10.1186/s11671-016-1618-z>
- Navalón S., García H. Nanoparticles for catalysis // *Nanomaterials*. 2016. V. 6(7). e.123.  
<https://doi.org/10.3390/nano6070123>
- Nazari N., Jookar Kashi F. A novel microbial synthesis of silver nanoparticles: its bioactivity, Ag/Ca-Alg beads as an effective catalyst for decolorization disperse blue 183 from textile industry effluent // *Sep. Purif. Technol.* 2020. e.118117.
- Negm N.A., Abubshait H.A., Abubshait S.A., Abou Kana M.T.H., Mohamed E.A., Betiha M.M. Performance of chitosan polymer as platform during sensors fabrication and sensing applications // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 165. P. 402–435.
- Nohwal B., Chaudhary R., Pundir C.S. Amperometric L-lysine determination biosensor amplified with L-Lysine oxidase nanoparticles and graphene oxide nanoparticles // *Process Biochem.* 2020. V. 97. P. 57–63.
- Noor M.O., Krull U.J. Silicon nanowires as field-effect transducers for biosensor development: a review // *Anal. Chim. Acta*. 2014. V. 825. P. 1–25.
- Novoselov K.S., Geim A.K., Morozov S.V., Jiang D., Zhang Y., Dubonos S.V., Grigorieva I.V., Firsov A.A. Electric field effect in atomically thin carbon films // *Science*. 2004. V. 306. P. 666–669.
- Núñez C., Triviño J.J., Arancibia V. A electrochemical biosensor for As(III) detection based on the catalytic activity of *Alcaligenes faecalis* immobilized on a gold nanoparticle-modified screen-printed carbon electrode // *Talanta*. 2020. e.121702.
- Othman A.M., Wollenberger U. Amperometric biosensor based on coupling aminated laccase to functionalized carbon nanotubes for phenolics detection // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 153. P. 855–864.
- Pasula R.R., Lim S. Engineering nanoparticle synthesis using microbial factories // *Engineering Biology*. 2017. V. 1(1). P. 12–17.



- Patil M.P., Kim G.-D. Marine microorganisms for synthesis of metallic nanoparticles and their biomedical applications // *Colloids Surf. B*. 2018. V. 172. P. 487–495.
- Peña-Bahamonde J., Nguyen H.N., Fanourakis S.K., Rodrigues D.F. Recent advances in graphene-based biosensor technology with applications in life sciences // *J. Nanobiotechnology*. 2018. V. 16(1). e. 75.
- Perveen R., Inamuddin, Nasar A., Beenish, Asiri A.M. Synthesis and characterization of a novel electron conducting biocomposite as biofuel cell anode // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 106. P. 755–762.
- Plachá D., Jampilek J. Graphenic materials for biomedical applications // *Nanomaterials (Basel)*. 2019. V. 9(12). e.1758.
- Plekhanova Y., Tarasov S., Bykov A., Prisyazhnaya N., Kolesov V., Sigaev V., Signore M.A., Reshetilov A. Multi-walled carbon nanotubes and the electrocatalytic activity of *Gluconobacter oxydans* as the basis of a biosensor // *Biosensors*. 2019. V. 9(4). e.137.
- Prabha S., Durgalakshmi D., Rajendran S., Lichtfouse E. Plant-derived silica nanoparticles and composites for biosensors, bioimaging, drug delivery and supercapacitors: a review // *Environ. Chem. Lett.* 2021. V. 19. P. 1667–1691.
- Puppo F., Carrara S., De Micheli G. Silicon nanowires for biosensing / reference module in chemistry, molecular sciences and chemical engineering. *isevier Inc*, 2017. P. 499–510.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.13479-1>
- Qing Z., Bai A., Xing S., Zou Z., He X., Wang K., Yang R. Progress in biosensor based on DNA-templated copper nanoparticles // *Biosens. Bioelectron.* 2019. V. 137. P. 96–109.  
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.05.014>
- Rabiee N., Ahmadvand S., Ahmadi S., Fatahi Y., Dinarvand R., Bagherzadeh M., Rabiee M., Tahriri M., Tayebi L., Hamblin M.R. Carbosilane dendrimers: drug and gene delivery applications // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2020. V. 59. e.101879.
- Ratautas D., Tetianec L., Marcinkevičienė L., Meškys R., Kulys J. Bioanode with alcohol dehydrogenase undergoing a direct electron transfer on functionalized gold nanoparticles for an application in biofuel cells for glycerol conversion // *Biosens. Bioelectron.* V. 2017. V. 98. P. 215–221.
- Rawat N.K., Ghosh R. Conducting polymer-based nanobiosensors / Eds. Han B., Nguyen T.A., Singh P.K., Tomer V.K., Farmani A. *Nanosensors for Smart Cities*, Elsevier Inc, 2020. P. 129–142. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819870-4.00008-6>
- Reshetilov A.N., Kitova A.E., Kolesov V.V., Yaropolov A.I. Mediator-free bioelectrocatalytic oxidation of ethanol on an electrode from thermally expanded graphite modified by *Gluconobacter oxydans* membrane fractions // *Electroanalysis*. 2015. V. 27. № 6. P. 1443–1448.
- Reza Jamei H., Rezaei B., Asghar Ensafi A. Ultra-sensitive and selective electrochemical biosensor with aptamer recognition surface based on polymer quantum dots and C60/MWCNTs-polyethylenimine nanocomposites for analysis of thrombin protein // *Bioelectrochemistry*. 2020. V. 138. e.107701.
- Sadhasivam S., Vinayagam V., Balasubramanian M. Recent advancement in biogenic synthesis of iron nanoparticles // *J. Mol. Struct.* 2020. V. 1217.e. 128372.
- Sahyar B.Y., Kaplan M., Ozsoz M., Celik E., Otles S. Electrochemical xanthine detection by enzymatic method based on Ag doped ZnO nanoparticles by using polypyrrole // *Bioelectrochemistry*. 2019. V. 130. e.107327.
- Saleh T.A. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities // *Environ. Technol. Innov.* 2020. V. 20. e.101067.
- Sarma M.K., Quadir M.G.A., Bhaduri R., Kaushik S., Goswami P. Composite polymer coated magnetic nanoparticles based anode enhances dye degradation and power production in microbial fuel cells // *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 119. P. 94–102.
- Sarycheva A., Gogotsi Y. Raman spectroscopy analysis of structure and surface chemistry of  $Ti_3C_2T_x$  MXene // *Chem. Mater.* 2020. V. 32. P. 3480–3488.
- Sasaki S., Karube I. The development of microfabricated biocatalytic fuel cells // *Trends Biotechnol.* 1999. V. 17(2). P. 50–52.
- Shakeel N., Ahamed M.I., Ahmed A., Inamuddin, Rahman M.M., Asiri A.M. Functionalized magnetic nanoparticle-reduced graphene oxide nanocomposite for enzymatic biofuel cell applications // *Int. J. Hydrog. Energy*. 2019. V. 44(52). P. 28294–28304.
- Sheikhzadeh E., Beni V., Zourob M. Nanomaterial application in bio/sensors for the detection of infectious diseases // *Talanta*. 2020. e.122026.
- Shetti N.P., Bukkitgar S.D., Reddy K.R., Reddy C.V., Aminabhavi T.M. Nanostructured titanium oxide hybrids-based electrochemical biosensors for healthcare applications // *Colloids Surf. B*. 2019a. V. 178. P. 385–394.
- Shetti N.P., Bukkitgar S.D., Reddy K.R., Reddy C.V., Aminabhavi T.M. ZnO-based nanostructured electrodes for electrochemical sensors and biosensors in biomedical applications // *Biosens. Bioelectron.* 2019b. V. 141. e.111417.
- Shi D., Guo Z., Bedford N. *Nanomaterials and Devices*. Elsevier Inc, 2015. 347 p.  
<https://doi.org/10.1016/C2012-0-03204-8>
- Singh P., Kim Y.-J., Zhang D., Yang D.-C. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms // *Trends Biotechnol.* 2016. V. 34(7). P. 588–599.
- Smutok O., Kavetsky T., Prokopiv T., Serkiz R., Wójnarowska-Nowak R., Šauša O., Novák I., Berek D., Melman A., Gonchar M. New micro/nanocomposite with peroxidase-like activity in construction of oxidases-based amperometric biosensors for ethanol and glucose analysis // *Anal. Chim. Acta*. 2021. V. 1143. P. 201–209.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.11.052>
- Sun M., Xin T., Ran Z., Pei X., Ma C., Liu J., Cao M., Bai J., Zhou M. A Bendable biofuel cell-based fully integrated biomedical nanodevice for point-of-care diagnosis of scurvy // *ACS Sens.* 2021. V. 6(1). P. 275–284.
- Tahar A.B., Szymczyk A., Tingry S., Vadgama P., Zelsmanne M., Tsujumura S., Cinquin P., Martin D., Zebda A. One-year stability of glucose dehydrogenase confined in a 3D carbon nanotube electrode with coated poly-methylene green: application as bioanode for a glucose biofuel cell // *J. Electroanal. Chem.* 2019. V. 847. e.113069.

- Talooki E.F., Ghorbani M., Rahimnejad M., Lashkenari M.S.* Evaluation of a visible light-responsive polyaniline nanofiber-cadmium sulfide quantum dots photocathode for simultaneous hexavalent chromium reduction and electricity generation in photo-microbial fuel cell // *J. Electroanal. Chem.* 2020. V. 873. e.114469.
- Tao X., Wang X., Liu B., Liu J.* Conjugation of antibodies and aptamers on nanozymes for developing biosensors // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 168. e.112537. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112537>
- Tasviri M., Rafiee-Pour H.-A., Ghourchian H., Gholami M.R.* Amine functionalized TiO<sub>2</sub>-carbon nanotube composite: synthesis, characterization and application to glucose biosensing // *Appl. Nanosci.* 2011. V. 1(4). P. 189–195.
- Tehrani Z., Thomas D.J., Guy O.J.* Electrochemical bio-functionalization of highly oriented pyrolytic graphite for immunosensor applications. // *J. Surface Science and Nanotechnology.* 2016. V. 14. P. 193–197.
- Tomalia D.A., Baker H., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P.* A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules // *Polym. J.* 1985. V. 17. P. 117–132.
- Tomalia D.A., Dewald J.R., Hall M.R., Martin S.J., Smith P.B.* Preprints of the 1st SPSJ International Polymer Conference, Society of Polymer Science Japan, Kyoto, 1984. P. 65.
- Venkateshalu S., Grace A.N.* MXenes – A new class of 2D layered materials: Synthesis, properties, applications as supercapacitor electrode and beyond // *Appl. Mater. Today.* 2020. V. 18. 100509.
- Vennila R., Hasina Banu A., Kamaraj P., Devikala S., Arthanareeswari M., Arockia selvi J., Pushpamali T., Buella J.G., Priya D., Sivasankari R.* A novel glucose sensor using green synthesized Ag Doped CeO<sub>2</sub> nanoparticles // *Materials Today: Proceedings.* 2018. V. 5(2). P. 8683–8690.
- Verma M.L., Naebe M., Barrow C.J., Puri M.* Enzyme immobilisation on amino-functionalised multi-walled carbon nanotubes: structural and biocatalytic characterisation // *PLoS ONE.* 2013. V. 8(9). e.73642.
- Viet N.X., Hoan N.X., Takamura Y.* Development of highly sensitive electrochemical immunosensor based on single-walled carbon nanotube modified screen-printed carbon electrode // *Mater. Chem. Phys.* 2019. V. 227. P. 123–129.
- Vogtle F., Buhleier E.W., Wehner W.* Cascade and nonskid-chain-like syntheses of molecular cavity topologies // *Synthesis.* 1978. V. 2. P. 155–158.
- Walther B.K., Dinu C.Z., Guldi D.M., Sergeyev V.G., Creager S.E., Cooke J.P., Guiseppi-Elie A.* Nanobiosensing with graphene and carbon quantum dots: recent advances // *Mater. Today.* 2020. V. 39. P. 23–46.
- Wang L., Hao L., Qi W., Huo X., Xue L., Liu Y., ... Lin J.* A sensitive *Salmonella* biosensor using platinum nanoparticle loaded manganese dioxide nanoflowers and thin-film pressure detector // *Sens. Actuator B-Chem.* 2020. V. 321. e.128616.
- Waris A., Din M., Ali A., Ali M., Afridi S., Baset A., Ullah Khan A.* A Comprehensive review of green synthesis of copper oxide nanoparticles and their diverse biomedical applications // *Inorg. Chem. Commun.* 2020. V. 123. e.108369.
- Wen G., Wen X., Shuang S., Choi M.M.F.* Whole-cell biosensor for determination of methanol // *Sens. Actuator B-Chem.* 2014. V. 201. P. 586–591.
- Wen H.-W.* Applications of nanotechnology in developing biosensors for food safety / Eds. Cheung P.C.K., Mehta B.M. *Handbook of Food Chemistry*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015. P. 1103–1136.
- Wu D., Ma Y., Cao Y., Zhang T.* Mitochondrial toxicity of nanomaterials // *Sci. Total Environ.* 2019. e.134994.
- Wu G., Gao Y., Zhao D., Ling P., Gao F.* Methanol/oxygen enzymatic biofuel cell using laccase and NAD<sup>+</sup>-dependent dehydrogenase cascades as biocatalysts on Carbon Nanodots Electrodes // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2017. V. 9(46). P. 40978–40986.
- Wu X., Xiong X., Owens G., Brunetti G., Zhou J., Yong X., Xie X., Zhang L., Wei P., Jia H.* Anode modification by biogenic gold nanoparticles for the improved performance of microbial fuel cells and microbial community shift // *Bioresour. Technol.* 2018. V. 270, P. 11–19.
- Yadav D., Amini F., Ehrmann A.* Recent advances in carbon nanofibers and their applications – a review // *Eur. Polym. J.* 2020. e.109963.
- Yang B., Zhang S., Fang X., Kong J.* Double signal amplification strategy for ultrasensitive electrochemical biosensor based on nuclease and quantum dot-DNA nanocomposites in the detection of breast cancer 1 gene mutation // *Biosens. Bioelectron.* 2019. V. 142. e.111544.
- Yin J., Dong Z., Liu Y., Wang H., Li A., Zhuo Z., Feng W., Fan W.* Toxicity of reduced graphene oxide modified by metals in microalgae: Effect of the surface properties of algal cells and nanomaterials // *Carbon.* 2020. V. 169. P. 182–192.
- Yola M.L., Atar N.* Development of cardiac troponin-I biosensor based on boron nitride quantum dots Including molecularly imprinted Polymer // *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 126. P. 418–424. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.11.016>
- Yoon H., Nah J., Kim H., Ko S., Sharifuzzaman M., Barman S.C., Xuan X., Kim J., Park J.Y.* A chemically modified laser-induced porous graphene based flexible and ultrasensitive electrochemical biosensor for sweat glucose detection // *Sens. Actuator B-Chem.* 2020. V. 311. e.127866.
- Yu C.-X., Xiong F., Liu L.-L.* Electrochemical biosensors with silver nanoparticles as signal labels // *Int. J. Electrochem. Sci.* 2020. V. 15. P. 3869–3890. <https://doi.org/10.20964/2020.05.53>
- Zhang C., Cai X.* Immobilization of horseradish peroxidase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/nanotubes composites for biocatalysis-degradation of phenol // *Compos. Interfaces.* 2018. V. 26(5). P. 379–396.
- Zhang Y., Huang S.* Significant improvements in the mechanical properties of chitosan functionalized carbon nanotubes/epoxy composites // *RSC Advances.* 2016. V. 6(31). P. 26210–26215.
- Zhang Y., Yang M., Portney N.G., Cui D., Budak G., Ozbay E., Ozkan M., Ozkan C.S.* Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial

- cells // *Biomed. Microdevices*. 2007. V. 10(2). P. 321–328.
- Zhao Y.-L., Stoddart J.F. Noncovalent functionalization of single-walled carbon nanotubes // *Acc. Chem. Res.* 2009. V. 42(8). P. 1161–1171.
- Zhong Y., Sun X., Wang S., Peng F., Bao F., Su Y., Li Y., Lee S.-T., He Y. Facile, large-quantity synthesis of stable, tunable-color silicon nanoparticles and their application for long-term cellular imaging // *ACS Nano*. 2015. V. 9(6). P. 5958–5967.  
<https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b00683>
- Zhou C., Zou H., Sun C., Li Y. Recent advances in biosensors for antibiotic detection: Selectivity and signal amplification with nanomaterials // *Food Chem.* 2021. V. 361(1). e.130109.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130109>
- Zhou X., Wang Y., Gong C., Liu B., Wei G. Production, structural design, functional control, and broad applications of carbon nanofiber-based nanomaterials: A comprehensive review // *Chem. Eng. J.* 2020. V. 402. e.126189.

## Nanomaterials for Controlled Adjustment of Electrochemical Biosensors and Biofuel Cells Parametres

Y. V. Plekhanova<sup>1, #</sup> and A. N. Reshetilov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganism FRC “Pushchino Centre for Biological Research of the RAS”, Prospect Nauki, 5, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia*

<sup>#</sup> *e-mail: plekhanova@ibpm.pushchino.ru*

Summaries of recent advances in biosensors (BS) and biofuel elements (BFE) development using nanomaterials (NM) are presented. NMs are considered as elements that can change the characteristics of biorecognition due to interaction with the biomaterial. The main effects of NMs are due to their ability to increase the electrical conductivity and effective surface of the bioreceptor part. The ideas obtained by domestic and foreign scientists about the possible mechanisms of NMs action are summarized. The prospects of using of NMs in the creation of biosensors and biofuel cells are considered.

*Keywords:* electrochemical biosensor, biofuel cell, nanomaterials

УДК 575.17:599.323.42

## РАЗНООБРАЗИЕ АЛЛЕЛЕЙ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ У ОБЫКНОВЕННОГО ХОМЯКА (*Cricetus cricetus*) В ГОРОДСКОЙ И СЕЛЬСКОЙ ПОПУЛЯЦИЯХ

© 2022 г. Н. Ю. Феоктистова\*, @, И. Г. Мещерский\*, Т. Н. Карманова\*,  
А. В. Гуреева\*, А. В. Суров\*

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

@E-mail: feoktistovanyu@gmail.com

Поступила в редакцию 03.04.2022 г.

После доработки 11.04.2022 г.

Принята к публикации 11.04.2022 г.

Известно, что городские популяции млекопитающих и птиц сталкиваются с большим разнообразием различных патогенов. На основе метода таргетного секвенирования на платформе Illumina определяли аллельное разнообразие экзона 2 гена *DRB* главного комплекса гистосовместимости в городской (г. Симферополь) и сельской популяциях обыкновенного хомяка. Для особей, обитающих в городе, отмечено большее количество аллелей, более высокие значения показателей гаплотипического и нуклеотидного разнообразия, меньшая доля особей с гомозиготным генотипом. Для обеих популяций характерно значительное превышение числа несинонимичных замен над синонимичными и почти каждому аллелю гена соответствует своя аминокислотная последовательность. Однако влияние положительно-го отбора на разнообразие вариантов антигенсвязывающих участков в аллелях гена *DRB* в условиях города выражено значительно сильнее. Полученные результаты позволяют предполагать, что устойчивость обыкновенных хомяков, обитающих в специфических и разнообразных условиях городской среды к различного рода патогенной нагрузке выше, чем в сельских популяциях.

**Ключевые слова:** обыкновенный хомяк, *Cricetus cricetus*, МНС класс II, *DRB*, Illumina, генетическое разнообразие, урбанистические условия, патогенная нагрузка, естественный отбор

**DOI:** 10.31857/S1026347022050079

Стремительное распространение городских экосистем на планете можно рассматривать как качественно новый этап развития жизни на Земле. Предполагается, что к 2030 г. почти 10% суши будет урбанизировано (Schilthuizen, 2018). Увеличение площади территорий, занятых урбанизированным ландшафтом, неизбежно приводит к включению в городские экосистемы новых видов, ранее не проявлявших склонности к синантропизму. Хотя для многих видов городские условия являются абсолютно неприемлемыми, другие могут заселять отдельные городские биотопы, удовлетворяющие их биологическим потребностям. В то же время для отдельных видов городские условия оказываются благоприятными, и плотность населения таких видов в городах может быть даже выше, чем в естественных биотопах. В качестве примера можно привести виды, сокращающие численность в естественных биотопах, но успешно заселяющие города. Это, например, сокол сапсан (*Falco peregrinus*), освоивший за последние 30 лет города Северной Америки и Европы (Сорокин, 2002), или ястреб Купера (*Accipiter*

*cooperii*), успешно заселяющий города США (Boggie, Mannan, 2014; Morinha *et al.*, 2016). Так города фактически стали местом сохранения этих редких видов.

Изучение экологических особенностей городской среды, выявление положительных и отрицательных факторов, определяющих возможность существования здесь животных, растений, а в итоге и самого человека, является актуальной проблемой экологии. Одно из важнейших направлений в исследовании процессов синурбанизации — изучение механизмов адаптаций животных к новым условиям, а также определение параметров оценки их благополучия. Городская среда имеет множество специфических особенностей, включающих как абиотические (температурный режим, влажность, химическое, шумовое, световое загрязнение и т.д.), так и биотические факторы. Среди последних — обитание на одной территории ряда автохтонных и инвазивных видов, формирующих новые, ранее не существовавшие сообщества с повышенной плотностью населения,

с нехарактерной кормовой базой и пр. (Luniak, 2004). Как следствие, в городе следует ожидать появления новых паразитарно-хозяйственных отношений и более высокую паразитарную нагрузку. Известно, что в целом городские популяции млекопитающих и птиц чаще подвергаются заражению паразитами и встречаются с большим количеством патогенов, чем сельские (Gliwicz *et al.*, 1980; Luniak, 2004). При этом вид сталкивается в городе с патогенами и паразитами, не характерными для естественных биотопов. Возникает вопрос, как иммунная система животных–синурбистов отвечает на эти городские “вызовы”. Оценка аллельного разнообразия генов главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex – МНС) может пролить свет на решение этой проблемы и служить показателем степени приспособленности вида к противодействию негативным факторам городской среды. Эти гены играют ключевую роль в иммунной защите организма, в том числе в обеспечении ответа на патогенную нагрузку (Klein, 1986; Hill *et al.*, 1991; Potts, Wakeland 1993; Brown, Eklund 1994; Hedrick, 1994; Edwards, Potts 1996; Janeway *et al.*, 2004; Acevedo-Whitehouse, Cunningham, 2006; Ujvari, Belov, 2011).

Исследование популяций белоногих хомячков (*Peromyscus leucopus*), обитающих в парках Нью-Йорка показало, что гены, ответственные за иммунные характеристики особей (так же как и ряд других, например, ответственных за переработку продуктов, богатых жирами), в городских условиях находятся под влиянием положительного отбора (Harris *et al.*, 2013, 2016; Harris, Munshi-South, 2017). Исследования красных рысей (*Lynx rufus*) в г. Таузенд-Оукс (США), столкнувшихся с эпидемией чесотки, показали, что до и после эпидемии в популяции обнаружены разные наборы аллелей генов МНС и TLR (Toll-Like Receptors – рецепторы, позволяющие распознавать консервативные структуры микроорганизмов и активирующие клеточный иммунный ответ). По всей видимости, эпидемию пережили только те животные, которые обладали подходящей комбинацией иммунных генов (Serieys *et al.*, 2015).

Одним из видов млекопитающих, активно осваивающих урбанизированные территории, является обыкновенный хомяк (*Cricetus cricetus*). В естественных биотопах численность этого вида за последние полвека катастрофически снизилась, особенно в западной части ареала (Surov *et al.*, 2016), вплоть до того, что в 2020 г. вид был включен в Красную книгу МСОП со статусом CR (виды, находящиеся на грани полного исчезновения) (Banaszek *et al.*, 2020). В то же время поселения обыкновенного хомяка в городах, зачастую достигают высокой численности (Feoktistova *et al.*, 2013; Суров и

др., 2015; Surov *et al.*, 2016; Feoktistova *et al.*, 2017). К настоящему времени популяции этого вида обитают в Нальчике, Грозном, Кисловодске, Владими́ре, Омске, Туле, Рязани, Москве и некоторых других городах России (Феоктистова и др., 2019), известны из г. Нур-Султан в Казахстане (Феоктистова и др., 2020), а также из целого ряда городов Европы (Niethammer, 1982; Thorns, 1998; Endres, Weber, 1999; Kupfernagel, 2003; Losík *et al.*, 2007; Schmelzer, Millesi, 2008; Banaszek, Ziomek, 2010; Čanády, 2013; Feoktistova *et al.*, 2013; Matysek *et al.*, 2013; Petrová *et al.*, 2018; Buczek, 2019).

Объектом нашего исследования стала популяция обыкновенного хомяка, обитающая в г. Симферополь (Крым) – самая крупная из известных городских популяций этого вида (Товпинец и др., 2006; Феоктистова и др., 2016). Мы определяли аллельное разнообразие экзона 2 гена *DRB*, входящего в состав МНС класса II у млекопитающих. Полученные значения сравнивались с отмеченными для поселений хомяка, расположенных в сельском антропогенном ландшафте Крыма. Цель работы состояла в оценке влияния обитания в урбоценозе на особенности иммунной системы данного вида.

Существенным затруднением при изучении аллельного разнообразия генов МНС является значительное число отличающих разные аллели нуклеотидных замен, а также, в ряде случаев, многокопийность. Для того, чтобы определить замены, отличающие последовательность каждого из присутствующих в генотипе животного аллелей, традиционно используют такие трудоемкие методы, как клонирование или анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP) с последующим секвенированием по Сэнгеру во многих повторностях. В нашей работе мы воспользовались технологией секвенирования нового поколения (NGS), в настоящее время успешно вытесняющей традиционные методы (Shiina *et al.*, 2015). Возможность считывания до 250 п.н. при длине интересующего нас участка 246 п.н. позволила прямо определять каждый вариант последовательности без необходимости совмещения отдельных фрагментов молекулы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения молекулярно-генетического анализа были использованы образцы тканей 20 особей обыкновенного хомяка, отловленных нами в городской черте Симферополя, и 20 особей, с окраин сельских поселений, расположенных далее 20 км от границ города. Образцы представляли собой зафиксированные в 96%-ном этаноле ткани уха или пальца (при отлове живых зверьков) или зафиксированная аналогичным образом

мышечная ткань от мертвых животных, полученных от хозяев сельскохозяйственных участков.

Тотальную ДНК выделяли с использованием набора реагентов Diatom™ DNA Prep (ООО “Лаборатория Изоген”, Москва, Россия) по инструкции производителя.

Для амплификации экзона 2 гена *DRB* использовали праймеры, предложенные в работе Smulders *et al.*, 2003:

Forward: 5-GAGTGTCAATTTCTACAACGGGA-3;  
Reverse: 5-CTCTCCGCGGCACAAAGGAA-3

Предварительно специфичность праймеров была проверена постановкой ПЦР с последующим секвенированием продукта методом Сэнгера. Полученные последовательности соответствовали представленным в работе (Smulders *et al.*, 2003), но содержали значительное количество нераспознаваемых (двойных) позиций.

Определение нуклеотидных последовательностей отдельных аллелей было выполнено в ООО “Евроген Лаб.” на основе таргетного секвенирования ПЦР-продуктов, полученных с использованием указанных праймеров на платформе Illumina.

Подготовку индивидуальных библиотек проводили в соответствии с протоколом, описанным в руководстве “16S Metagenomic Sequencing Library Preparation” (Part # 15044223 Rev. B; Illumina) с увеличенным количеством циклов амплификации на первой стадии ПЦР (35 циклов). После получения ампликонов библиотеки были очищены и смешаны эквимольно с помощью SequalPrep™ Normalization Plate Kit (“ThermoFisher”). Контроль качества полученных пулов библиотек был проведен с помощью системы Fragment Analyzer, количественный анализ – с помощью qPCR.

Пул библиотек был секвенирован на Illumina MiSeq с использованием реактивов MiSeq Reagent Kit v2 Nano: длина прочтений – 250 п.н. с двух сторон фрагментов, 500 циклов. Для контроля параметров секвенирования использовали библиотеку фага PhiX.

Файлы FASTQ были получены с помощью программного обеспечения bcl2fastq v2.17.1.14 Conversion Software (Illumina). При обработке файлов в формате FASTQ с парными чтениями для каждого образца на первом этапе анализа прямые и обратные чтения были слиты с помощью инструмента Bbmerge из пакета BBTools v38.87 (Bushnell *et al.*, 2017). Чтения, которые не сливались однозначно без замен, не учитывали. Слитые чтения были выровнены на референс одного из вариантов последовательности *DRB* exon 2 известных для обыкновенного хомяка (Crcr-*DRB1*\*14 allele, GenBank AJ490324, Smulders *et al.*, 2003) с помощью

программного обеспечения Bowtie2 (Langmead, Salzberg, 2012) с опцией local. Из полученных выравниваний были извлечены чтения с длиной не менее 240 п.н. при длине референтной последовательности 246 п.н. (включая области посадки праймеров). Для дальнейшего анализа были использованы только образцы, для которых было получено не менее 50 последовательностей, отвечавших данному условию.

В наборе последовательностей, полученных для каждого образца, были определены уникальные варианты (аллели) и посчитана частота их встречаемости. Для дальнейшего анализа были отобраны варианты (а), представленные в каждом случае не менее, чем 10 повторностями; (б) составляющие не менее 5% от общего количества полученных для данной особи последовательностей и (в) представленные числом повторностей, составляющим не менее 25% от количества повторностей аллеля с более высокой частотой в данном образце.

Из отобранных на основании этих условий последовательностей были исключены участки, соответствующие областям посадки прямого (22 п.н.) и обратного (20 п.н.) праймеров, а также две начальные (консервативные) позиции – с тем, чтобы первая позиция последовательности соответствовала первой позиции триплета. Идентичность последовательностей аллелей, отмеченных у разных особей, определяли с использованием онлайн-сервиса FaBox 1.61 (Villesen, 2007).

Варианты последовательностей, отобранные для последующего анализа, а также соответствующие им последовательности аминокислот проверяли на соответствие ожидаемому участку генома с использованием функции BLAST на сайте NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Учитывая, что на различия в количестве повторностей разных аллелей, полученных для каждого образца, в определенной степени влияют случайные отклонения в ходе секвенирования, а также отсутствие данных о возможном количестве повторов данного локуса (многокопийность) у обыкновенного хомяка, описание индивидуальных генотипов по соотношению представленности разных аллелей в индивидуальных наборах не проводили. Исключение составляло определение гомозиготных генотипов, которые регистрировались для особей, у которых в полученном наборе последовательностей был отмечен лишь один вариант, отвечающий указанным выше условиям. Последующее сравнение двух анализируемых выборок проводили на основании набора аллелей, отмеченных в каждой выборке, с указанием на число животных, в генотипе которых данный аллель был отмечен.

Сравнение выборок было проведено в программе Arlequin v.3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) с использованием Fst и Φst критериев, а также с оценкой показателей гаплотипического (аллельного) и нуклеотидного разнообразия для каждой выборки.

Медианная сеть вариантов нуклеотидных последовательностей была построена методом Median Joining в программе Network 4.612 (Bandelt *et al.*, 1999). Полученные варианты нуклеотидных последовательностей были транслированы, определено число вариантов аминокислотных последовательностей и их соответствие отмеченным аллелям гена для каждой выборки, а также для всей исследованной совокупности.

В аминокислотных последовательностях были определены позиции, потенциально ответственные за связывание антигена – на основе данных, приведенных в работе (Brown *et al.*, 1993) и аналогично тому, как это было выполнено ранее для представителей рода *Peromyscus* (Richmond, Davuey, 2003).

Характер нуклеотидных последовательностей в полученных выборках был проанализирован на количество и соотношение несинонимичных и синонимичных замен в программе MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Также в этой программе был выполнен Z-test на оценку влияния положительного отбора на увеличение разнообразия аминокислотных последовательностей. Тест был проведен на основе модифицированного метода Nei-Golobogoi с принимаемой вероятностью отношения частоты транзиций и трансверсий 2.0 и подтвержден бутстреп-тестом, включавшим 10000 реплик. Тест был выполнен как для полного состава последовательностей (201 п.н., 67 кодонов), так и только для регионов, ответственных за связывание антигена (57 п.н., 19 кодонов).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результирующие файлы, содержавшие от 53 до 2996 последовательностей нужной длины, были получены для 17 особей, отловленных в городе, и 19 из сельских популяций. Для каждого образца было получено от 15 до 606 вариантов нуклеотидных последовательностей, от 1 до 4, из которых отвечали перечисленным выше условиям. После удаления участков посадок праймеров все признанные валидными последовательности имели длину 201 п.н., не содержали стоп-кодонов, а также делеций или вставок, сдвигающих рамку считывания. Всего в двух исследованных выборках было отмечено 25 вариантов (аллелей), последовательности которых депонированы в базе данных GenBank NCBI (табл. 1). При проверке с использованием функции BLAST для всех этих вариантов было установлено соответствие гену

**Таблица 1.** Аллели локуса *DRB1*, экзон 2, отмеченные в ходе исследования

Аллель	Номер Генбанка	Количество особей в обобщенной выборке (n = 36)
Crcr-DRB*15	ON081883	12
Crcr-DRB*16	ON081884	4
Crcr-DRB*17	ON081885	3
Crcr-DRB*18	ON081886	1
Crcr-DRB*19	ON081887	7
Crcr-DRB*20	ON081888	4
Crcr-DRB*21	ON081889	1
Crcr-DRB*22	ON081890	2
Crcr-DRB*23	ON081891	1
Crcr-DRB*24	ON081892	2
Crcr-DRB*25	ON081893	3
Crcr-DRB*26	ON081894	3
Crcr-DRB*27	ON081895	2
Crcr-DRB*28	ON081896	2
Crcr-DRB*29	ON081897	1
Crcr-DRB*30	ON081898	1
Crcr-DRB*31	ON081899	1
Crcr-DRB*32	ON081900	1
Crcr-DRB*33	ON081901	1
Crcr-DRB*34	ON081902	2
Crcr-DRB*35	ON081903	1
Crcr-DRB*36	ON081904	1
Crcr-DRB*37	ON081905	1
Crcr-DRB*38	ON081906	1
Crcr-DRB*39	ON081907	1

*DRB1* МНС класса II у грызунов. Для 21 варианта максимальное сходство (91.1–99.4%) было с 6 последовательностями, известными для *Cricetus cricetus* (AJ490311, AJ490314, AJ490316–317, AJ490319, AJ490320, AJ490322–323), для 3 вариантов (Crcr-DRB\*25, Crcr-DRB\*26 и Crcr-DRB\*29 из городской популяции) – с последовательностью, известной для *Apodemus flavicollis* (JQ858341, сходство 93.3–93.8%), для аллеля Crcr-DRB\*27 (городская популяция) – с последовательностью *Rattus norvegicus* (AY626204, сходство 93.8%). Использование функции BLAST для соответствующих данным аллелям аминокислотных последовательностей также показало их соответствие бета цепи антигенов МНС

**Таблица 2.** Характеристика разнообразия исследованных выборок

	Городская популяция	Сельская популяция	Обобщенная выборка
Объем выборки ( <i>n</i> )	17	19	36
Число отмеченных аллелей	19	11	25
Среднее число аллелей в генотипе особи	1.71	1.42	1.56
Доля особей с гомозиготным генотипом, %%	47.15	79.0	61.1
Индекс гаплотипического разнообразия	0.961	0.866	0.932
Индекс нуклеотидного разнообразия, %%	10.15	8.14	9.69

класса II у грызунов (class II histocompatibility antigen, beta domain).

Между двумя исследованными выборками были отмечены достоверные различия как по частоте встречаемости разных аллелей ( $F_{st} = 0.0316$ ,  $p = 0.022$ ), так и по степени различия в нуклеотидных последовательностях ( $\Phi_{st} = 0.09027$ ,  $p = 0.0001$ ).

Количество аллелей, отмеченных в генотипе одного животного, варьировало от 1 (гомозиготность, отмечена у большинства особей) до 4. Характеристика разнообразия выборок представлена в табл. 2. Значения всех показателей разнообразия в городской популяции были заметно выше, чем в сельских.

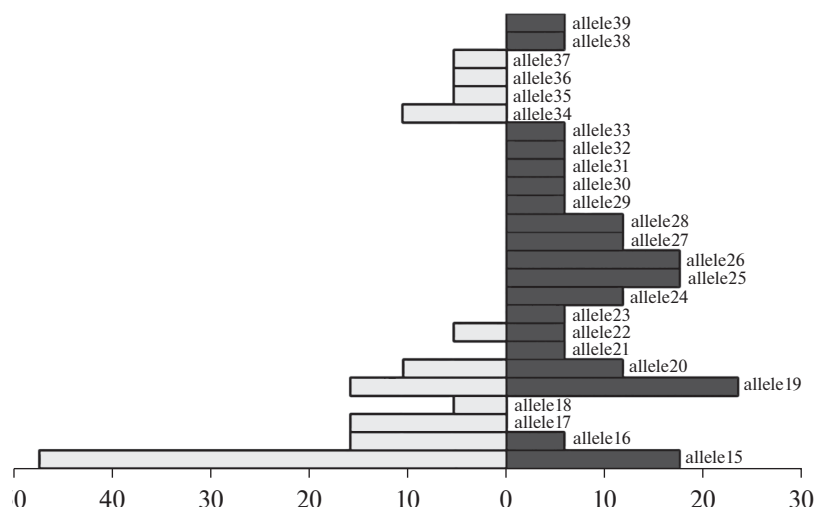
Встречаемость разных аллелей в выборках показана на рис. 1. В загородной популяции частота одного из аллелей (Ccr-DRB\*15, встречен у 47.4% особей) значительно превышала частоту остальных, встречавшихся не более, чем у 15.8% (аллели Ccr-DRB\*16, Ccr-DRB\*17 и Ccr-DRB\*19, остальные с еще меньшей частотой) особей каждый. В городской популяции подобного доминирования ка-

кого-либо одного аллеля не наблюдалось. Максимальная частота (23.5% особей) здесь была отмечена у аллеля Ccr-DRB\*19, и еще три аллеля (Ccr-DRB\*15, Ccr-DRB\*25 и Ccr-DRB\*26) были отмечены у 17.6% особей каждый. В среднем каждый аллель был отмечен только у 7.5% особей в городской и у 5.7% особей в сельской популяции.

Большинство аллелей (73.7% в городской и 54.5% в сельской) были уникальными для каждой популяции. Из 25 отмеченных в нашем исследовании аллелей только 5 (20%) являлись общими для обеих выборок, остальные были встречены только в одной популяции каждый (рис. 1, 2). Два из них (Ccr-DRB\*15 и Ccr-DRB\*19) относились к числу относительно часто встречающихся в обеих популяциях и три были отмечены в обеих или в одной популяции только у 1–2 особей каждый.

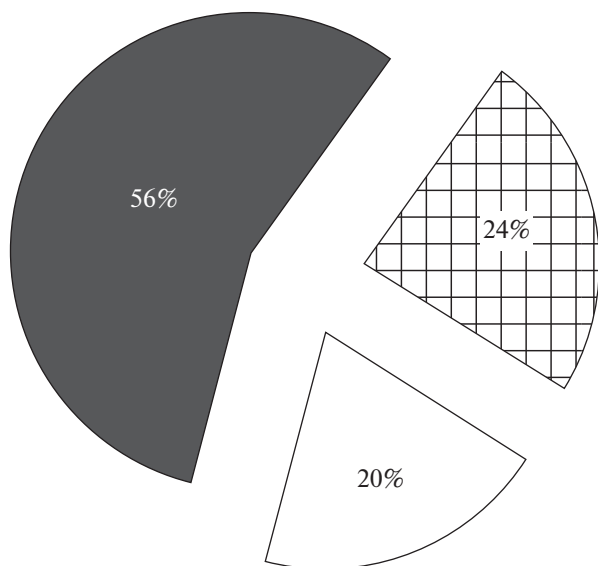
Медианная сеть последовательностей аллелей, отмеченных в городской и сельской популяциях, представлена на рис. 3.

В центре сети расположены два из наиболее часто встречающихся общих для обеих выборок



**Рис. 1.** Доля особей (%%) в городской (справа, темная заливка) и сельской (слева, светлая заливка) популяциях, у которых был отмечен тот или иной аллель.





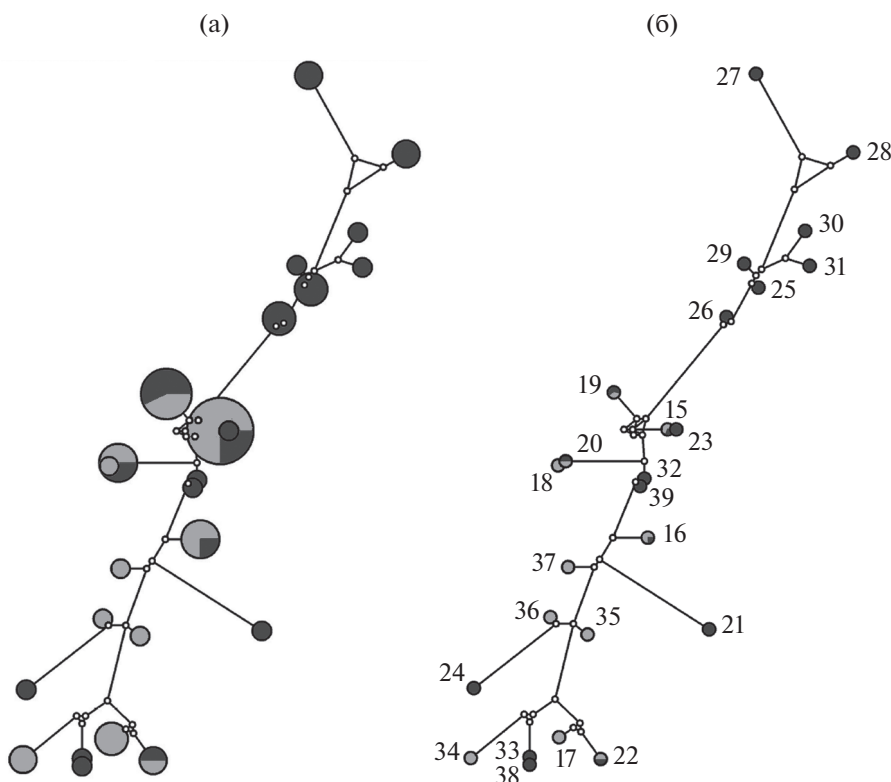
**Рис. 2.** Для суммарного числа аллелей – доля встреченных только в городской (серый цвет), только в сельской (штриховка) или в обеих (белый цвет) популяциях.

аллелей. Еще два общих аллеля также расположены ближе к центру. Одна из двух ветвей представлена аллелями, встречающимися либо в город-

ской, либо в сельской популяции, другая – уникальными вариантами, встреченными только в городской популяции. Однако выявление конкретных филогенетических связей между отдельными вариантами в большинстве случаев невозможно из-за значительного количества неразрешаемых узлов.

Большая часть вариантов нуклеотидных последовательностей (23 из 25) соответствовали оригинальным вариантам белка (рис. 4). Исключения составили два аллеля: присутствующий только в городской популяции *Cсгг-DRB\*25*, кодирует ту же аминокислоту, что и аллель *Cсгг-DRB\*15*, встречающийся в обеих популяциях. Аллель *Cсгг-DRB\*18* уникальный для сельской популяции кодирует ту же аминокислоту, что и *Cсгг-DRB\*22*, также характерный для обеих популяций. Следует отметить, что аллели *Cсгг-DRB\*25* и *Cсгг-DRB\*18* были отмечены только у одного животного каждый.

Число несинонимичных замен в последовательностях аллелей существенно превышало число синонимичных как в каждой из исследованных выборок, так и в целом (табл. 3). При этом величина *dN/dS* в выборке из городской популяции была существенно выше, чем в сельской, как при



**Рис. 3.** Медианная сеть отмеченных вариантов последовательностей экзона 2 гена *DRB*. Темная заливка – городская, светлая заливка – сельская популяция, белые кружки – медианные векторы. (а) – диаметр кружков пропорционален встречаемости аллелей в обобщенной выборке, (б) – диаметр кружков одинаков. Числа соответствуют обозначениям аллелей, см. табл. 1.

	10	20	30	40	50	60	
AY219812 Peer1a	QRVRYLDRYI	YNREEYVRF	SDVGEYIAVT	ELGRPDAEYW	NSQKEILED	RASVDTFCRH	NYGVGES
	-----*--*	-----*--*	-----*--*	-----*--*	-----*--*	-----*--*	-----*--*
Crcr-DRB*15	.....	.Q.N....	.....FR...	.....	...DF.QK	..E...V...	....F..
Crcr-DRB*16	...LVV.F	....A...	.....R...	.....	...DFM.Q	..E...V...	.....
Crcr-DRB*17	...F.H.F	..G.....	.....R...	...S.F	...L.Q.	..E...Y...	.....
Crcr-DRB*18	...E.H.H	.H.Q.F...	.....FR...	.....	...L.Q.	..E...V...	...LD.
Crcr-DRB*19	...F.E.F	.Q.I....	.....R...	.....	...DM.QT	..E...V...	....F..
Crcr-DRB*20	...E.H.H	.H.Q.F...	.....FR...	.....	...L.Q.	..E...V...	...LD.
Crcr-DRB*21	...LVV.IV	....A...	.....FR...	...L	...L.QK	..E...V...	...LD.
Crcr-DRB*22	...F.H.F	.GK....	.....FR...	...S.F	...L.Q.	..E...Y...	...LD.
Crcr-DRB*23	.....	.Q.N....	.....FR...	.....	...DF.QK	..E...V...	....F..
Crcr-DRB*24	...E.H.H	.....	.....FR...	...L	...L.QK	..A...Y...	.....
Crcr-DRB*25	...M.L.V.L	....H....	.....FR...	...L	...QM	..A.E.V...	...EGFD.
Crcr-DRB*26	...M.F....	.....	.....FR...	.....	...QT	..A.E.V...	...EGFD.
Crcr-DRB*27	...F.E...F	...R....	.....R...	...R.Y	...D.RK	..A...Y...	...E.SDK
Crcr-DRB*28	...LVV.W	.S.G.N...	.....FR...	...S	...DF.QT	..A...Y...	...E.LDK
Crcr-DRB*29	...M.L.V.L	....F....	.....FR...	...L	...QM	..A.E.V...	...E.SD.
Crcr-DRB*30	...M.L.N.L	....F....	.....FR...	...A.L	...FM.QK	..A.E.V...	...FD.
Crcr-DRB*31	...L.....	.....	.....FR...	...L	...FM.QM	..A.E.V...	...FD.
Crcr-DRB*32	...F.E....	....A...	.....FR...	.....	...L.Q.	..E...V...	....F..
Crcr-DRB*33	...LVA.W	....F....	.....FR...	...S.F	...L.QK	..E...Y...	.....
Crcr-DRB*38	...LVA.W	....F....	.....FR...	...S.F	...L.QK	..E...Y...	....K.
Crcr-DRB*39	...F.E.V	....A...	.....FR...	.....	...L.Q.	..E...V...	....F..
Crcr-DRB*34	...LVV.F	.....	.....R...	...S.F	...DM.QK	..E...V...	.....
Crcr-DRB*35	...F.H.F	.Q.F....	.....FR...	.....	...L.QK	..E...Y...	.....
Crcr-DRB*36	...F.H.F	.....	.....FR...	.....	...L.QK	..E...Y...	.....
Crcr-DRB*37	...FVV.F	.GK.N...	.....R...	.....	...L.QK	..E...V...	.....

Рис. 4. Аминокислотные последовательности секвенированного участка экзона 2 гена *DRB*. В качестве референтной использована последовательность *Peromyscus eremicus* (Richmond *et al.*, 2003). Одинаковые аминокислотные остатки обозначены точками. Предположительно антигенсвязывающие позиции указаны звездочками.

сравнении полных последовательностей секвенированных участков, так и только антигенсвязывающих регионов.

В пределах кодируемых отсекувенированными участками экзона 2 гена *DRB* аминокислотных последовательностей 19 из 67 аминокислотных остатков предположительно являлись ответственными за связывание антигена (рис. 4).

Достоверное соответствие гипотезе воздействия балансирующего отбора было отмечено только для антигенсвязывающих регионов в обобщенной выборке и выборке из городской, но не из сельской популяции (табл. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Генетическое разнообразие является важнейшим фактором благополучного существования популяций. При этом его изучение должно сочетать оценку как по нейтральным генетическим маркерам митохондриальной и ядерной ДНК (в том числе, микросателлитным локусам), так и по генам, ответственным за адаптивные характеристики организма, в частности генам МНС (Pfrender *et al.*, 2000; Reed, Frankham 2001; Hedrick, 2001; McKay, Latta, 2002; Luikart *et al.*, 2003; Palo *et al.*, 2003; Gomez-Mestre, Tejedo, 2004; Ujvari *et al.*, 2005; Ujvari, Belov, 2011; Shiina *et al.*, 2015). По-

следние играют ключевую роль в обеспечении иммунных функций организма при инфекционной и паразитарной нагрузке, и наличие полиморфизма этих генов может свидетельствовать о благополучном состоянии популяций (Biedrzycka *et al.*, 2011). Разнообразие генов МНС является важным фактором при формировании прогноза выживания для исчезающих популяций животных в дикой природе (Ujvari, Belov, 2011, Shiina *et al.*, 2015).

Повышению полиморфизма аллелей МНС в индивидуальном генотипе способствует свойственная генам этого комплекса многокопийность — наличие более чем одного локуса определенного типа. Это явление широко распространено у млекопитающих: у лошадей (Fraser, Bailey, 1996), приматов (Bontrop *et al.*, 1999; Khazand *et al.*, 1999), крупного рогатого скота (Lewin *et al.*, 1999), разных видов кошачьих (Kennedy *et al.*, 2002), морских львов (Bowen *et al.*, 2004). Отмечена многокопийность генов МНС и у грызунов, в частности, у песчанок (*Gerbillurus paeba*) (Harf, Sommer, 2005) и бобров (*Castor fiber pohlei*) (Babik *et al.*, 2005). Вопрос о многокопийности гена *DRB* у обыкновенного хомяка до настоящего времени оставался открытым. При исследовании европейских популяций ни для одного из 70 образцов не было обнаружено

**Таблица 3.** Результаты оценки числа несинонимичных (dN) и синонимичных (dS) замен и результаты Z-теста на соответствие наблюдающихся разнообразия вариантов нуклеотидных последовательностей результату балансирующего отбора. Статистически достоверные значения выделены жирным шрифтом

	Полные последовательности секвенированных участков			Антигенсвязывающие регионы		
	Городская популяция	Сельская популяция	Обобщенная выборка	Городская популяция	Сельская популяция	Обобщенная выборка
dN (S.E.)	15.71 (2.71)	11.35 (2.60)	14.32 (2.68)	4.91 (1.52)	4.86 (1.58)	5.10 (1.57)
dS (S.E.)	4.71 (1.14)	4.69 (1.41)	5.01 (1.26)	1.04 (0.48)	1.34 (0.75)	1.18 (0.59)
dN/dS	3.335	2.422	2.861	4.736	3.62	4.311
Z	1.123	-0.094	0.5	<b>2.109</b>	0.961	<b>1.791</b>
p(Z)	0.132	1	0.309	<b>0.019</b>	0.169	<b>0.038</b>

наличие более двух аллелей (Smulders *et al.*, 2003). Однако это исследование проводилось методом клонирования с амплификацией и секвенированием не более, чем 10 молекул (клонов) на образец. В нашем случае, при секвенировании многократно большего числа ампликонов, была показана возможность присутствия в геноме обыкновенного хомяка до 4 разных последовательностей экзона 2 гена DRB, представленных со сходно высокой частотой.

Обитание в условиях города зачастую характеризуется обеднением генетического разнообразия, выявляемого по нейтральным маркерам (Kajdacsi *et al.*, 2013; Chiappero *et al.*, 2011; MunshiSouth *et al.*, 2014; Феоктистова и др., 2016; 2019). Связано это как с ограниченным числом приспособившихся к городским условиям особей основателей, так и ограниченностью и изолированностью пригодных для обитания территорий, что способствует усилению инбридинга. Однако в условиях города животные становятся мишенью для большого числа нестандартных патогенов и паразитов из-за высокой плотности синантропных видов и разнообразных стрессовых факторов (Gliwicz *et al.*, 1980; Luniak, 2004). Поэтому накопление большего высокого разнообразия генов, отвечающих за иммунные характеристики, является крайне актуальным для выживания видов-синурбистов.

Обыкновенный хомяк, как уже отмечалось, является видом, включенным в Красную книгу МСОП в связи с резким сокращением численности естественных популяций. Исследования генетического разнообразия по нейтральным маркерам (как

по мтДНК, так и по микросателлитным локусам), показали резкое сокращение генетического разнообразия его популяций в крайней западной части ареала, в то время как в популяциях из Восточной Европы разнообразие по этим маркерам остается достаточно высоким (Smulders *et al.*, 2003; Neumann *et al.*, 2004, 2005; Banaszek *et al.*, 2011; Reiners *et al.*, 2014).

Единственное исследование, оценивающее аллельное разнообразие генов МНС в популяциях обыкновенного хомяка было проведено также для естественных популяций западной части ареала вида (Smulders *et al.*, 2003). Было выявлено резкое снижение разнообразия (вплоть до сохранения единственного аллеля экзона 2 гена DRB) в популяциях Франции и Голландии, тогда как анализ музейных образцов продемонстрировал, что еще в начале прошлого века в этих популяциях присутствовало, по крайней мере, еще 7 аллелей. С резким сокращением аллельного разнообразия DRB в крайней западной части ареала вида связывают снижение средней массы тела, ухудшение размножения и снижение устойчивости к паразитарной нагрузке. В то же время в современной популяции из Чехии (Восточная Европа) у 15 животных было отмечено 13 различных аллелей гена DRB, и большинство животных были гетерозиготными (Smulders *et al.*, 2003). Учитывая, что обыкновенный хомяк в последние 50 лет начал активно заселять города, остро встал вопрос – насколько благополучными являются синурбические популяции этого вида? Ранее мы исследовали особенности распространения митохондриальных линий в по-

пуляциях обыкновенного хомяка в ряде городов Кавказа и Крыма (Феоктистова и др., 2016; 2019) и показали, что в городах разнообразие этих линий обеднено. Однако в городских популяциях обнаружены и уникальные варианты, не встречающиеся вне города. Так, на территории города Симферополя отмечено только три из семи вариантов объединенного участка гена цитохрома *b* и контрольного региона, представленных на Крымском полуострове. При этом два из них были уникальными для этого города.

Проведенный нами анализ аллельного состава гена *DRB* показал, что, напротив, именно городская популяция отличается повышенным разнообразием этого гена по всем показателям (число аллелей, отмеченных в популяции, среднее число аллелей в генотипе особи, рассчитанные для популяции индексы гаплотипического и нуклеотидного разнообразия). Число аллелей (11) в сельских популяциях обыкновенного хомяка на Крымском полуострове было несколько ниже, чем для благополучной негородской популяции Чехии (13), но для Симферополя это значение (19) было существенно большим. Хотя число несинонимичных замен превышало число синонимичных в обоих выборках с Крымского полуострова, соотношение dN/dS и значение показателя действия положительного отбора в городской популяции было заметно выше, чем сельской.

Полученные результаты позволяют предполагать, что представители городской популяции Симферополя хорошо “подготовлены” к противостоянию “городским вызовам”, обладая большей устойчивостью к инфекциям и паразитарной нагрузке. Скорее всего, это является следствием отбора к специфическим условиям городской среды.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (20-04-00102а) и (19-34-90059).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Сорокин А.Г. Современные проблемы сохранения и восстановления популяций редких птиц // Сохранение и восстановление биоразнообразия. Разд. V. М.: Изд-во Научного и учебно-методического центра, 2002. С. 131–147.
- Суров А.В., Поплавская Н.С., Богомолов П.Л., Кропоткина М.В., Товпинец Н.Н., Кацман Е.А., Феоктистова Н.Ю. Синурбанизация обыкновенного хомяка (*Cricetus cricetus* L., 1758) // Росс. журн. биологических инвазий 2015. Т. 8. № 4. С. 105–116.
- Товпинец Н.Н., Евстафьев И.Л., Карасева Е.В. Склонность к синантропии обыкновенного хомяка (*Cricetus cricetus*) по наблюдениям в Крыму. В сб.: Фауна в антропогенном ландшафте. Мат. териологической школы. 2006. № 8. 136–145.
- Феоктистова Н.Ю., Мецкерский И.Г., Суров А.В., Богомолов П.Л., Товпинец Н.Н., Поплавская Н.С. Генетическая структура городской популяции обыкновенного хомяка (*Cricetus cricetus*) // Генетика. 2016. Т. 52. № 2. С. 221–221.
- Феоктистова Н.Ю., Мецкерский И.Г., Богомолов П.Л., Мецкерский С.И., Саян А.С., Ситникова Е.Ф., Власов А.А., Власова О.П., Суров А.В. К вопросу о границе между двумя филогруппами обыкновенного хомяка (*Cricetus cricetus*) (Cricetinae, Rodentia) // Поволжский экол. журн. 2019. № 4. С. 485–494.
- Феоктистова Н.Ю., Мецкерский И.Г., Богомолов П.Л., Мецкерский С.И., Кацман Е.А., Пельгунова Л.А., Поташикова Е.П., Суров А.В. Непреднамеренно поставленный эксперимент—заселение вновь созданного городского парка видом синурбистом обыкновенным хомяком *Cricetus cricetus* L., 1758 // Изв. РАН. Сер. биол. 2020. № 2. С. 224–232.
- Acevedo-Whitehouse K., Cunningham A.A. Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics? // Trends in Ecol. Evol. 2006. № 21(8). P. 433–438.
- Babik W., Durka W., Radwan J. (2005). Sequence diversity of the MHC DRB gene in the Eurasian beaver (*Castor fiber*) // Mol. Ecology. V. 14(14). P. 4249–4257.
- Banaszek A., Ziomek J. The common hamster (*Cricetus cricetus* L) population in the city of Lublin // Ann. Univers. Mariae Curie Skłodowska Lublin Polonia. 2010. V. 65. № 1. P. 59–66.
- Banaszek A., Jadwiszczak K.A., Ziomek J. Genetic variability and differentiation in the Polish common hamster (*Cricetus cricetus* L.): genetic consequences of agricultural habitat fragmentation // Mamm. Biol. 2011. V. 76(6). P. 665–671.
- Banaszek A., Bogomolov P., Feoktistova N., La Haye M., Monecke S., Reiners T.E., Rusin M., Surov A., Weinhold U., Ziomek J. // *Cricetus Cricetus*. The IUCN Red List of Threatened Species. 2020.
- <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020>
- <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020>
- Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. P. 37–48.
- <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Biedrzycka A., Kloch A., Buczek M., Radwan J. Major histocompatibility complex DRB genes and blood parasite loads in fragmented populations of the spotted suslik *Spermophilus suslicus* // Mamm. Biology. 2011. V. 76(6). P. 672–677.
- Boggie M.A., Mannan R.W. Examining seasonal patterns of space use to gauge how an accipiter responds to urbanization // Landscape and Urban Planning. 2014. V. 124 P. 34–42.
- Bontrop R.E., Otting N., de Groot N.G., Doxiadis G.G. Major histocompatibility complex class II polymorphisms in primates // Immunological reviews. 1999. V. 167(1). P. 339–350.

- Bowen L., Aldridge B.M., Gulland F., Van Bonn W., DeLong R., Melin S., Lowenstine L.J., Stott J.L., Johnson M.L. Class II multifunctionality generated by variable MHC-DRB region configurations in the California sea lion (*Zalophus californianus*) // Immunogenetics. 2004. V. 56(1). P. 12–27.
- Brown J.H., Jardetzky T.S., Gorga J.C., Stern L.J., Urban R.G., Strominger J.L., Wiley D.C. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1 // Nature. 1993. V. 364(6432). P. 33–39.
- Brown J.L., Eklund A. Kin recognition and the major histocompatibility complex: an integrative review // The American Naturalist. 1994. V. 143(3). P. 435–461.
- Buczek T. Inwentaryzacja chomika europejskiego *Cricetus cricetus* na obszarze Górów Czechowskich w Lublinie. 2019
- Bushnell B., Rood J., Singer E. BBMerge – Accurate paired shotgun read merging via overlap // PLoS ONE. 2017. V. 12(10). e0185056.
- Chiappero M.B., Panzetta Dutari G.M., Gomez D. et al. Contrasting genetic structure of urban and rural populations of the wild rodent *Calomys musculinus* (Cricetidae, Sigmodontinae) // Mammal. Biol. 2011. V. 76. P. 41–50.
- <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2010.02.003>
- Čanády A. New site of the European hamster (*Cricetus cricetus*) in the urban environment of Košice city (Slovakia) // Zoology and Ecology. 2013. V. 23. P. 61–65.
- Edwards S.V., Potts W.K., Polymorphism of genes in the major histocompatibility complex (MHC): Implications for conservation genetics of vertebrates. In: Molecular Genetic Approaches in Conservation (eds TB Smith and RK Wayne) Oxford University Press. N.Y., 1996. P. 214–237.
- Endres J., Weber U. Möglichkeiten und Maßnahmen zur langfristigen Erhaltung des Feldhamsters (*Cricetus cricetus* L.) im Nordbereich der Universität Göttingen // Dokumentation zum Pilotforschungsprojekt “Feldhamster” am Institut für Wildbiologie und Jagdkunde der Georg-August-Universität Göttingen, 1999. 263 p. (in German)
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis // Evol. Bioinform. Online. 2005. V. 1. P. 47–50. PMID: PMC2658868
- Feoktistova N.Y., Surov A.V., Tovpinetz N.N., Kropotkina M.V., Bogomolov P.L., Siutz C., Haberl W., Hoffmann I.E. The common hamster as a synurbist: a history of settlement in European cities // Zoologica Poloniae. 2013. V. 58(3–4). P. 116.
- Feoktistova N.Y., Meschersky I.G., Bogomolov P.L., Sayan A.S., Poplavskaya N.S., Surov A.V. Phylogeographic structure of the Common hamster (*Cricetus cricetus* L.): Late Pleistocene connections between Caucasus and Western European populations // PLoS One. 2017. V. 12(11). e0187527.
- Fraser D.G., Bailey E. Demonstration of three DRB loci in a domestic horse family // Immunogenetics. 1996. V. 44(6). P. 441–445.
- Gomez-Mestre I., Tejedo M. Contrasting patterns of quantitative and neutral genetic variation in locally adapted populations of the natterjack toad, *Bufo calamita*. // Evolution. 2004. V. 58. P. 2343–2352.
- Gliwicz J. Ecological aspects of synurbization of Striped Field Mouse *Apodemus agrarius* (Pall.) // Wiadomości Ekol. 1980. V. 26. P. 185–196.
- Harf R., Sommer S. Association between major histocompatibility complex class II DRB alleles and parasite load in the hairy-footed gerbil, *Gerbillurus paeba*, in the southern Kalahari // Mol. Ecology. 2005. V. 14(1). P. 85–91.
- Harris S.E., Munshi-South J., Oberfell C., O'Neill R. Signatures of rapid evolution in urban and rural transcriptomes of white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) in the New York metropolitan area // PLoS One. 2013. V. 8(8). e74938.
- Harris S.E., Munshi-South J. Scans for positive selection reveal candidate genes and local adaptation of *Peromyscus leucopus* populations to urbanization // bioRxiv. 2016. 038141.
- Harris S.E., Munshi-South J. Signatures of positive selection and local adaptation to urbanization in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) // Mol. Ecology. 2017. V. 26(22). P. 6336–6350.
- Hedrick P.W., Miller P.S. Rare alleles, MHC and captive breeding // In Conservation genetics. 1994. P. 187–204. Birkhäuser, Basel.
- Hedrick P.W. Conservation genetics: Where are we now? Trends Ecol. Evol. 2001. V. 16. P. 629–636.
- Hill A.V.S., Allsopp C.E.M., Kwiatowski D., Anstey N.M., Twumasi P., Rowe P.A., Bennett S., Brewster D., McMichael A.J., Greenwood B.M. Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria // Nature. 1991. V. 352. P. 595–600.
- Janeway C., Travers P., Walport M., Shlomchik M. Immunobiology. Garland Science. N.Y., 2004.
- Kajdacs B., Costa F., Hyseni C. et al. Urban population genetics of slum dwelling rats (*Rattus norvegicus*) in Salvador, Brazil // Mol. Ecol. 2013. V. 22. P. 5056–5070.
- <https://doi.org/10.1111/mec.1245517>
- Kennedy L., Ryvar R., Gaskell R., Addie D., Willoughby K., Carter S., Thomson W., Ollier W.E.R., Radford A. Sequence analysis of MHC DRB alleles in domestic cats from the United Kingdom // Immunogenetics. 2002. V. 54(5). P. 348–352.
- Khazand M., Peiberg C., Nagy M., Sauermann U. Mhc-DQ-DRB haplotype analysis in the rhesus macaque: evidence for a number of different haplotypes displaying a low allelic polymorphism // Tissue antigen. 1999. V. 54(6). P. 615–624.
- Klein J., Figueroa F. Evolution of the major histocompatibility complex // Critical reviews in immunology. 1986. V. 6(4). P. 295–386.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. Mol. Biol. and Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549.
- Kupfernagel C. Raumnutzung umgesiedelter Feldhamster *Cricetus cricetus* (Linnaeus, 1758) auf einer Ausgleichsfläche bei Braunschweig // Braunschweiger Naturkundliche Schriften. 2003. V. 6. № 4. P. 857–887.
- Langmead B., Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nature Methods. 2012. V. 9. P. 357–359.

- Lewin A.Y., Long C.P., Carroll T.N. The coevolution of new organizational forms // *Organ. Science*. 1999. V. 10(5). P. 535–550.
- Losík J., Lisická L., Hříbková J., Tkadlec E. Demografická struktura a procesy v přírodní populaci křeček (*Cricetus cricetus*) na Olomoucku // *Lynx (Praha)*, n. s. 2007. V. 38. P. 21–29.
- Luikart G., England P.R., Tallmon D., Jordan S., Taberlet P. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing // *Nat. Rev. Genet.* 2003. V. 4. P. 981–999.
- Luniak M. Synurbization—adaptation of animal wildlife to urban development. In *Proceedings 4th international urban wildlife symposium*. 2004. (P. 50–55). Tucson: University of Arizona.
- Matysek M., Hédzak M., Kuc M., Osmolska A. The occurrence site of the common hamster *Cricetus cricetus* in Krakow // [In Polish with English summary] *Chrońmy Przyr. Ojcz.* 2013. V. 69(5). P. 430–436
- McKay J.K., Latta R.G. Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *Trends in ecology and evolution*, 2002. V. 17(6). P. 285–291.
- Morinha F., Ramos P.S., Gomes S., Mannan R.W., Guedes-Pinto H., Bastos E. Microsatellite markers suggest high genetic diversity in an urban population of Cooper's hawks (*Accipiter cooperii*) // *J. Genetics*. 2016. V. 95(1). P. 19–24.
- MunshiSouth J., Nagy C. Urban Park characteristics, genetic variation, and historical demography of whitefooted mouse (*Peromyscus leucopus*) populations in New York City, Peer J., 2014. V. 2. P. 310–315.  
<https://doi.org/10.7717/peerj.310>
- Neumann K., Jansman H., Kayser A., Maak S., Gattermann R. Multiple bottlenecks in threatened western European populations of the common hamster *Cricetus cricetus* (L.) // *Conservation Genetics*. 2004. V. 5(2). P. 181–193.
- Neumann K., Michaux J., Maak S., Jansman A.H., Kayser A., Mundt G., Gattermann R. Genetic spatial structure of European common hamsters (*Cricetus cricetus*) – a result of repeated range expansion and demographic bottlenecks // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. P. 1473–1483.
- Niethammer J. *Cricetus cricetus* (Linnaeus, 1758) – Feldhamster // In: *Handbuch der Säugetiere Europas* / Eds. J. Niethammer, F. Krapp. Wiesbaden, 1982. Bd. 2/1, Rodentia II. P. 7–28.
- Palo J.U., O'Hara R.B., Laugen A.T., Laurila A., Primmer C.R., Merila J. Latitudinal divergence of common frog (*Rana temporaria*) life history traits by natural selection: Evidence from a comparison of molecular and quantitative genetic data. // *Mol. Ecol.* 2003. V. 12. P. 1963–1978.
- Petrová I., Petrílková M., Losík J., Gouveia A., Damugi I.E., Tkadlec E. Density-related pattern of variation in body growth, body size and annual productivity in the common hamster // *Mamm. Biol.* 2018. V. 91(1). P. 34–40.
- Pfrender M.E., Spitze K., Hicks J., Morgan K., Latta L., Lynch M. Lack of concordance between genetic diversity estimates at the molecular and quantitative-trait levels // *Conserv. Genet.* 2000. V. 1. P. 263–269.
- Potts W.K., Wakeland E.K. Evolution of MHC genetic diversity: a tale of incest, pestilence and sexual preference // *Trends in Genetics*. 1993. V. 9(12). P. 408–412.
- Reed D.H., Frankham R. How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis // *Evolution*. 2001. V. 55. P. 1095–1110
- Reiners T.E., Eidenschenk J., Neumann K., Nowak C. Preservation of genetic diversity in a wild and captive population of a rapidly declining mammal, the Common hamster of the French Alsace region // *Mammal. Biol.* 2014. V. 79(4). P. 240–246.
- Richmond T.J., Davey C.A. The structure of DNA in the nucleosome core // *Nature*. 2003. V. 423(6936). P. 145–150.
- Schilthuisen M. Darwin in de stad: evolutie in de urban jungle. Atlas Contact; 2018. May 23.
- Schmelzer E., Millesi E. Surface activity patterns in a population of European hamsters (*Cricetus cricetus*) in an urban environment // In: *The Common Hamster in Europe. Ecology, management, genetics, conservation, reintroduction. Proceedings Meeting of the International Hamster Workgroup* / Ed. G. Nechay. 2008. P. 19–22.
- Shiina T., Yamada Y., Aarnink A., Suzuki S., Masuya A., Ito S., Ido D., Yamanaka H., Iwatani C., Tsuchiya H., Ishigaki H., Itoh Y., Ogasawara K., Kulski J.K., Blancher A. Discovery of novel MHC-class I alleles and haplotypes in Filipino cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) by pyrosequencing and Sanger sequencing // *Immunogenetics*, 2015. V. 67(10). P. 563–578.
- Serieys L.E., Lea A., Pollinger J.P., Riley S.P., Wayne R.K. Disease and freeways drive genetic change in urban bobcat populations // *Evol. Applic.* 2015. V. 8(1). P. 75–92.
- Smulders M.J.M., Snoek L.B., Booy G., Vosman B. Complete loss of MHC genetic diversity in the Common Hamster (*Cricetus cricetus*) population in the Netherlands. Consequences for conservation strategies // *Cons. Genet.* 2003. V. 4(4). P. 441–451.
- Surov A., Banaszek A., Bogomolov P., Feoktistova N., Monecke S. Dramatic global decrease in the range and reproduction rate of the European hamster *Cricetus cricetus* // *Endangered Species Res.* 2016. V. 31. P. 119–145.
- Thorns H.-J. Die Göttinger Feldhamster-Story // BUND Landesverband Niedersachsen e.V., BUNDmagazin. 1998 // 4. [http://www.bundniedersachsen.de/service/bundmagazin/41998/die\\_goettinger\\_feldhamster\\_story/](http://www.bundniedersachsen.de/service/bundmagazin/41998/die_goettinger_feldhamster_story/)
- Ujvari B., Olsson M., Madsen T. Discrepancy in mitochondrial and nuclear polymorphism in meadow vipers (*Vipera ursinii*) questions the unambiguous use of mtDNA in conservation studies // *Amphibia-Reptilia*. 2005. V. 26(3). P. 287–292.
- Ujvari B., Belov K. Major histocompatibility complex (MHC) markers in conservation biology // *Intern. J. Mol. Sci.* 2011. V. 12(8). P. 5168–5186.
- Villesen P. FaBox: an online toolbox for fasta sequences // *Mol. Ecol. Notes*. 2007. V. 7. P. 965–968.

## Allele diversity of the Major Histocompatibility Complex in the Common Hamster (*Cricetus cricetus*) in Urban and Rural Populations

N. Y. Feoktistova<sup>1, #</sup>, I. G. Meschersky<sup>1</sup>, T. N. Karmanova<sup>1</sup>, A. V. Gureeva<sup>1</sup>, and A. V. Surov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, Leninsky pr., 33, Moscow, 119071 Russia

<sup>#</sup>e-mail: feoktistovanyu@gmail.com

Based on the results of targeted sequencing on the Illumina platform we compared the allelic diversity of exon 2 of the *DRB* gene in urban (city of Simferopol) and rural populations of the common hamster. The urban population significantly differs from the rural one in terms of the composition and diversity of gene alleles. For individuals living in the city, a larger number of alleles, higher values of haplotype and nucleotide diversity indices, and a smaller proportion of individuals with a homozygous genotype were noted. Both populations are characterized by a significant excess of non-synonymous substitutions over synonymous ones and almost every allele of a gene corresponds to a different amino acid sequence. However, the influence of positive selection on the diversity of variants of antigen-binding sites in the alleles of the *DRB* gene in urban conditions is much more pronounced. The data suggest that resistance of common hamsters living in specific and varied conditions of the urban environment to various kinds of pathogenic load is higher than in rural populations.

**Keywords:** common hamster, *Cricetus cricetus*, MHC class II, *DRB*, Illumina, genetic diversity, urban conditions, pathogen load, natural selection

УДК 599.323.4:591.431.4:575.24

## ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И НАСЛЕДОВАНИЕ НЕТИПИЧНОЙ ФОРМЫ ANTERIOR LOBE M<sup>1</sup> КОПЫТНЫХ ЛЕММИНГОВ (*Dicrostonyx*, RODENTIA, ARVICOLINAE)

© 2022 г. М. И. Чепраков<sup>®</sup>

Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, 620144 Россия

<sup>®</sup>E-mail: Cheprakov@ipae.uran.ru

Поступила в редакцию 28.07.2021 г.

После доработки 20.01.2022 г.

Принята к публикации 25.03.2022 г.

В работе изложено описание отклонений от типичной формы anterior lobe M<sup>1</sup> (консервативный элемент жевательной поверхности) у копытных леммингов (*Dicrostonyx*) и выяснение характера их наследования на материале из лабораторных колоний. Фенотипы нетипичной формы отличаются по степени сложности. Особи, имеющие нетипичную форму anterior lobe, являются рецессивными гомозиготами. Какой фенотип реализует рецессивная гомозигота зависит от различных факторов, таких как номер выводка или частота самцов в семье. Вероятно, эти факторы могут взаимодействовать в своем влиянии на частоту проявления рецессивных гомозигот. Полиморфизм изучаемого признака обладает существенным эволюционным потенциалом и открывает новое направление эволюционных преобразований жевательной поверхности коренных зубов в подсемействе Arvicolinae.

**Ключевые слова:** изменчивость, наследование, нетипичная форма anterior lobe M<sup>1</sup>, копытный лемминг, *Dicrostonyx*

**DOI:** 10.31857/S1026347022050055

Anterior lobe (передняя непарная петля) M<sup>1</sup> (первого верхнего моляра) является консервативным элементом жевательной поверхности не только у копытных леммингов *Dicrostonyx* (Gloger, 1841), но и во всем подсемействе Arvicolinae (Агаджанян, 2009). В этой группе основная изменчивость жевательной поверхности верхних моляров сосредоточена в задней их части, нижних моляров – в передней (Бородин, 2009). Это связывают с жевательными движениями, происходящими, в основном, в передне-заднем направлении (Громов, Поляков, 1977). Недавно было показано, что в выборках из лабораторных колоний копытных леммингов может встречаться нетипичная форма anterior lobe M<sup>1</sup> (Markova, Smirnov, 2018). У грызунов мутантные гены, вызывающие изменения фенотипов моляров в то числе M<sup>1</sup>, приводят преимущественно к появлению таких атавистических признаков, как дополнительные зубы (Marangoni *et al.*, 2015). Особое значение имеют такие новые мутации, которые способствуют появлению ранее неизвестных фенотипических структур зубов (Hulsey *et al.*, 2020). Именно такая мутация лежит в основе той фенотипической изменчивости, которая представлена в настоящей работе.

Целью настоящей работы является: выявление и описание фенотипической изменчивости отклонений от типичной формы anterior lobe M<sup>1</sup> *Dicrostonyx* и выяснение характера наследования этой нетипичной формы anterior lobe M<sup>1</sup> на материале из лабораторных колоний.

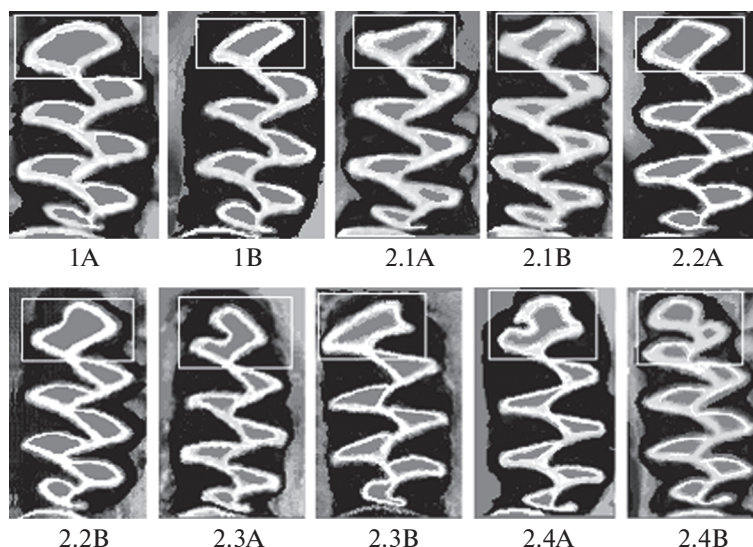
### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на леммингах, содержащихся при свободном доступе к воде и корму, комнатной температуре (17 ± 2.0°C) и естественном, сезонном изменении фотопериода (Екатеринбург, 56°48' с.ш.). При рождении детенышей индивидуально метили, в 25–30 дней отсаживали их от родителей, а в 1.5–2 мес. формировали пары. В качестве корма большую часть года давали морковь, яблоки, зерна овса в шелухе и ивовые прутья. Летом кормили травяной смесью, овсом и ивой.

В исследовании использовали выборки черепов из четырех лабораторных колоний. Время содержания колоний составляло 1–1.5 года. Были получены потомки до четвертого поколения включительно.

Основатели первой колонии были пойманы на стационаре “Еркута”, недалеко от устья р. Паютаяха, юго-запад п-ова Ямал (68°13' с.ш., 69°09' в.д.) в





**Рис. 1.** Морфотипическая изменчивость anterior lobe (выделено прямоугольником)  $M^1$  у копытных леммингов. 1А и 1В – варианты типичной формы anterior lobe. 2.1А–2.4В – варианты нетипичной формы anterior lobe.

начале августа 2004 г. Популяция копытных леммингов находилась на низкой стадии цикла численности. Оценки численности и плотности, сделанные автором при отлове основателей лабораторной колонии, составляли  $3 \pm 2$  экз. на 100 лов.-сут и  $0.3 \pm 0.2$  экз./га. Основателями стали 1 самец, 4 самки, черепов – 57 шт.

Основатели второй и третьей колоний были пойманы на стационаре “Хадыта” в бассейне р. Хадытаяха, юг п-ова Ямал ( $66^{\circ}59'$  с.ш.,  $69^{\circ}33'$  в.д.). Летом 1984 г. около двух десятков леммингов было завезено в виварий. Из них основателями колонии стали 6 самцов и 7 самок. В этом году была низкая стадия популяционного цикла – 0.2 экз./га (Балахонов и др., 1997), черепов – 101 шт.

Летом 1985 г. копытные лемминги были завезены с пиковой стадии популяционного цикла – 5 экз./га (Балахонов и др., 1997). Основателями стали 6 самцов и 6 самок, черепов – 103 шт.

Летом 1984 г. из заповедника на о-ве Врангеля привезли копытных леммингов, из которых была сформирована четвертая лабораторная колония. Популяция леммингов находилась на низкой стадии цикла численности – около 6 экз. на 100 лов.-сут (Денисенко, 1986). Основателями стали 8 самцов и 12 самок, черепов – 167 шт.

Первые три выборки относятся к виду *Dicrostonyx torquatus* (Pallas, 1778), четвертая к *Dicrostonyx groenlandicus* (Trail, 1823) (Abramson, Lisovsky, 2012). Материалы хранятся в Музее ИЭРиЖ УрО РАН, г. Екатеринбург.

Выявленный признак обозначен как нетипичная форма (atypical form) anterior lobe  $M^1$ , а фенотип, маркированный этим признаком, обозначен

как af. Фенотип типичной формы anterior lobe  $M^1$  *Dicrostonyx* обозначен как TF.

Фенотип TF представлен двумя вариантами морфотипа (рис. 1, 1А и 1В). Для них характерно наличие выпуклой передней поверхности anterior lobe  $M^1$ . Варианты отличаются степенью выпуклости передней поверхности этой передней доли: у 1А она более выпуклая, чем у – 1В. Рис. 1 составлен из цифровых фотографий зубов отдельных особей.

Фенотип af представлен четырьмя морфотипами (рис. 1, 2.1А–2.4В). Первый морфотип af имеет прямую (2.1А) или вогнутую (2.1В) переднюю поверхность передней доли  $M^1$ . Во втором морфотипе af передняя доля  $M^1$  имеет форму ромба (2.2А) или ромба с прогибом (2.2В). В третьем морфотипе af на передней доле  $M^1$  присутствует один входящий угол: дополнительный буккальный входящий угол (BRA0, 2.3А) либо дополнительный лингвальный входящий угол (LRA0, 2.3В). В четвертом морфотипе af на передней доле  $M^1$  присутствуют как буккальный, так и лингвальный дополнительные входящие углы. Эти углы могут быть слабо выражены (2.4А) или полностью выражены (2.4В). В последнем варианте anterior lobe  $M^1$  представлена в виде трех петель.

Всего выявлено 64 зуба у 37 особей, имеющих фенотип af. В колонии “Еркута-04” выявлено 34 зуба у 19 особей (из них две пойманы в природе), в колонии “Хадыта-85” – 14 зубов у 9 особей (из них одна поймана в природе), в колонии “Хадыта-84” – 11 зубов у 6 особей, в колонии “о-в Врангеля-84” – 5 зубов у 3 особей.

Для сравнения выборок из разных колоний между собой разные варианты фенотипа af объ-

единяли в две категории сложности. В первую категорию вошли варианты морфотипов 2.1А–2.2В, во вторую – 2.3А–2.4В.

Для выяснения характера наследования отклонений от типичной формы anterior lobe M<sup>1</sup> проводили посемейный анализ расщеплений в разных вариантах скрещивания.

При статистической обработке данных использовали пакет программ Stat Soft STATISTICA for Windows 6.0: статистика  $\chi^2$ , точный критерий Фишера – Fisher exact test (Fisher exact), ранговая корреляция Спирмена – Rs. Интегральную гомогенность независимых таблиц сопряженности в целом для нескольких выборок проверяли с помощью процедуры объединения *P*-значений по Фишеру (Fisher combination test – FCT, Животовский, 1991).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фенотип af anterior lobe M<sup>1</sup> имеет преимущественно двухстороннее проявление, так как в 27 (73%) случаев он встречается на обеих сторонах челюсти (справа и слева). Он обнаружен в 4 (11%) случаях только с левой стороны и в 6 (16%) случаях только с правой стороны.

Наиболее редкими являются варианты четвертого морфотипа af: 2.4А и 2.4В. Они представлены по одному экземпляру, что в сумме составляет 3%. Потом идут варианты первого морфотипа af: 2.1А и 2.1В, которые в сумме составляют 7 экз. или 11%. Вариант 2.2А второго морфотипа af: (23 экз., 36%) преобладает над вариантом 2.2В (4 экз., 6.5%). Абсолютное преобладание у варианта 2.3А третьего морфотипа af: (27 экз., 42%) над вариантом 2.3В (1 экз., 1.5%).

Частота особей с фенотипом af самая высокая (33%) в колонии “Еркута-04” по сравнению с другими колониями: “Хадыта-85” (9%), “Хадыта-84” (6%), “о-ов Врангеля-84” (2%) ( $P < 0.001$  для Fisher exact). В колонии “Хадыта-85” она выше, чем в колонии “о-ов Врангеля-84” ( $P < 0.02$  для Fisher exact).

Сравнение выборок зубов фенотипа af из колоний по категориям сложности показало, что морфотипы наиболее сложной второй (2.3А–2.4В) категории преобладают в колонии “Хадыта-85” (86%,  $N = 14$ ,  $P < 0.005$  для Fisher exact) по сравнению с колониями “Еркута-04” (35%,  $N = 34$ ) и “Хадыта-84” (27%,  $N = 11$ ). Последние две колонии между собой не отличаются по этому показателю ( $P = 0.46$  для Fisher exact). Выборка из колонии “о-ов Врангеля-84” (60%,  $N = 5$ ) не отличается от выборки из всех других колоний ( $P > 0.24$  для Fisher exact) в том числе из-за своей малой величины. Так как колония “Хадыта-85” единственная из всех происходит от животных с пиковой стадии популяционного цикла, есть основание

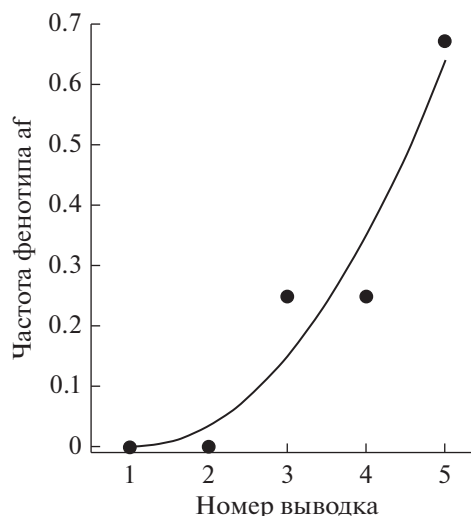


Рис. 2. Зависимость частоты фенотипа atypical form anterior lobe M<sup>1</sup> (af) от номера выводка в семье № 9.

заключить, что высокая плотность популяции может приводить к повышению частоты сложных морфотипов фенотипа af anterior lobe M<sup>1</sup> *Dicrostonyx*, то есть к усилению выраженности этого признака.

В 15 выводках из всех семей, где в потомстве наблюдали расщепление по форме anterior lobe M<sup>1</sup> у самцов и самок, для каждого выводка была протестирована однородность расщепления у обоих полов. Для выводка минимальное значение  $P = 0.17$  (Fisher exact). FCT по всем выводкам дает  $P = 0.97$ .

В 10 семьях, в потомстве которых наблюдали расщепление у обоих полов, была протестирована его однородность. Для семьи минимальное значение  $P = 0.11$  (Fisher exact). FCT по всем семьям дает  $P = 0.53$ .

Расщепления у самцов и самок в разных вариантах скрещивания однородны. Минимальное значение  $P = 0.12$  (Fisher exact). FCT по вариантам скрещивания дает  $P = 0.29$ . Так как расщепления по самцам и самкам однородны, дальнейший анализ проводился по обоим полам.

В 11 семьях наблюдали расщепление по форме anterior lobe M<sup>1</sup> в разном числе выводков: в 5 семьях – в одном, в 3 семьях – в двух, в 2 семьях – в трех и в 1 семье – в пяти выводках. В трех семьях с одним выводком расщепления не было. Была проанализирована однородность расщепления в разных выводках одной семьи. Минимальное значение  $P = 0.11$  (Fisher exact) при сравнении между собой двух выводков одной семьи. FCT по всем выводкам дает  $P = 0.90$ . Однако в семье № 9 с 5 выводками была обнаружена положительная связь номера (очередности) выводка с частотой фенотипа atypical form anterior lobe M<sup>1</sup> (рис. 2).

**Таблица 1.** Расщепление по признаку atypical form anterior lobe M1 в потомстве родителей разных фенотипов

№ семьи	Фенотип родителей	Фенотип потомков		
		typical form	atypical form	всего
1	Typical form × typical form	2	1	3
2		8	3	11
3		6	2	8
4	Typical form × atypical form	3	3	6
5		2	2	4
6		2	2	4
7		2	1	3
8		7	3	10
9		14	4	18
10		10	2	12
11		2	0	2
12		2	0	2
13		2	0	2
14	Atypical form × atypical form	1	2	3

Ранговая корреляция Спирмена для этой связи равна 0.94,  $P < 0.02$ . В дальнейшем данные по выводкам в пределах семьи были объединены и расщепление анализировали в 14 семьях.

Результаты посемейных расщеплений по форме anterior lobe M<sup>1</sup> в разных вариантах скрещивания приведены в табл. 1. Характер генетической детерминации изменчивости формы anterior lobe M<sup>1</sup> оказался относительно простым.

**Гипотеза генетической детерминации предполагает, что различия в форме anterior lobe M<sup>1</sup> у копытных леммингов (*Dicrostonyx*) определяются моногенно.** Особи с типичной формой anterior lobe M<sup>1</sup> — это гетерозиготы или доминантные гомозиготы с фенотипом TF. Особи, имеющие нетипичную форму anterior lobe M<sup>1</sup>, являются рецессивными гомозиготами с фенотипом af. Какой фенотип (af или TF) реализует рецессивная гомозигота может зависеть от различных факторов.

**Анализ расщеплений.** При скрещивании родителей с фенотипом TF в семьях № 1–3 выщепляются особи с фенотипом af (табл. 1). Расщепления в разных семьях однородны. FCT по всем семьям дает  $P = 0.93$ . Суммарно по всем трем семьям наблюдаемое соотношение фенотипа af к фенотипу TF составляет 6 : 16 и согласуется с отношением моногенного расщепления 1 : 3 ( $\chi^2 = 0.06$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.80$ ). Следовательно, особи с фенотипом af — рецессивные гомозиготы, которые показывают полное проявление.

В скрещиваниях, где один родитель имеет фенотип TF, а у другого родителя представлен фено-

тип af в семьях № 4–10, выщепляются потомки с фенотипом af. В семьях № 11–13 потомков с фенотипом af нет. Однако у самца (фенотип TF) из семьи № 11 в семье № 5 с другой самкой выщепляются потомки с фенотипом af. У самца (фенотип TF) из семьи № 12 в семье № 6 с другой самкой также выщепляются потомки с фенотипом af. Значит, оба этих самца являются гетерозиготами. В семье № 13 самец с фенотипом TF может быть как гетерозиготой, так и доминантной гомозиготой, поэтому эта семья была исключена из анализа. Расщепления в разных семьях однородны. Минимальное значение  $P = 0.18$  (Fisher exact) при сравнении между собой двух семей. FCT по всем выводкам дает  $P = 0.93$ . Несмотря на это удалось выявить фактор, влияние которого на частоту потомков с фенотипом af в семьях этого варианта скрещивания статистически значимо ( $R_s = -0.92$ ,  $P < 0.001$ , рис. 3). На графике видно, что при частоте самцов среди потомков в семье от 0 до 0.25 включительно частота потомков с фенотипом af в семьях соответствует теоретически ожидаемой и равной 0.5. При повышении частоты самцов среди потомков больше 0.25 частота потомков с фенотипом af монотонно убывает.

Разделение семей на две группы: первая с частотой самцов в семье до 0.4 (семьи № 4–7) и вторая с частотой самцов в семье равной или более 0.4 (семьи № 8–12) позволило выясниться, что наблюдаемое расщепление на фенотипы af и TF в первой группе (8 : 9) согласуется с теоретически ожидаемым 1 : 1 ( $\chi^2 = 0.06$ ,  $df = 1$ ,  $P > 0.80$ ). Во вто-

рой группе отличие наблюдаемого расщепления на фенотипы af и TF (9 : 35) от теоретически ожидаемого 1 : 1 статистически высоко значимо ( $\chi^2 = 15.4$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.0001$ ), т.е. наблюдаем неполное проявление (0.41%) рецессивных гомозигот. Соотношения фенотипов в первой и второй группах отличаются друг от друга  $P < 0.042$ . (Fisher exact). Однако суммарное по 9 семьям в этом варианте скрещивания наблюдаемое расщепление (17 : 44) также отличается от ожидаемого 1 : 1 статистически значимо ( $\chi^2 = 12.0$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ) с проявлением 56%.

Таким образом, особи с фенотипом af в семьях № 4–12 – рецессивные гомозиготы, а особи с фенотипом TF – гетерозиготы. Рецессивные гомозиготы показывают полное проявление в семьях, когда частота самцов в семье меньше 0.4, и показывают неполное проявление, когда частота самцов равна или выше 0.4. Одним из механизмов, влияющих на проявление рецессивных гомозигот, является положительная связь частоты фенотипа af с номером выводка, показанная на примере семьи № 9. В роли другого механизма выступает отрицательная связь частоты фенотипа af с частотой самцов в семье. Вероятно, что факторы: номер выводка и частота самцов в семье могут взаимодействовать в своем влиянии на проявление гомозигот.

В семье 14, где оба родителя имеют фенотип af, выщепился потомок с фенотипом TF (табл. 1). Это может быть результатом обратной геновариации либо результатом действия другого гена, влияющего на форму anterior lobe M<sup>1</sup>, которое проявилось под влиянием генов-модификаторов у данной особи.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что у копытных леммингов встречаются самки трех кариотипов  $X^0X^0$ ,  $X^*X^0$  и  $X^*Y$ .  $X^0$  – хромосома дикого типа,  $X^*$  – мутантная хромосома, которая при сочетании в геноме с Y хромосомой приводит к развитию организма женского пола (Gileva, 1987; Fredga, 1988, 1994, Kozielska *et al.*, 2010). Только в потомстве самок  $X^*X^0$  и  $X^*Y$  встречаются самки с кариотипом  $X^*Y$  в пропорции 0.33 и 0.50 (теоретически) и 0.41 и 0.55 (фактически). Для самок  $X^*X^0$  и  $X^*Y$  характерна пониженная частота самцов в потомстве: теоретически – 0.25 и 0.33, фактически – 0.27 и 0.29 (Gileva, 1987, Kozielska *et al.*, 2010). Самки  $X^*Y$  встречаются во всех пяти хромосомных расах, выделяемых по количеству A хромосом у копытных леммингов. Число хромосом (2n) колеблется между расами от 28 до 48 (Fedorov *et al.*, 1999; Fredga *et al.*, 1999). Зависимость частоты фенотипа atypical form anterior lobe M1 в семье от частоты самцов в ней позволяет предполагать, что полное проявление рецессивных гомозигот с фенотипом af происходит в потомстве

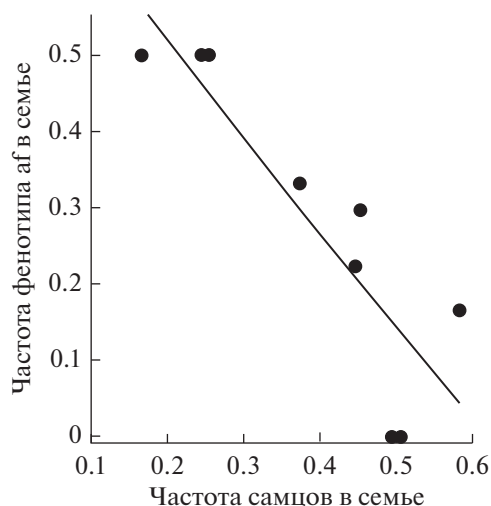


Рис. 3. Зависимость частоты фенотипа atypical form (af) anterior lobe M1 в семье от частоты самцов в семье в скрещиваниях TF × af.

тех семей, в родительской паре которых самки имеют мутантную  $X^*$  хромосому. Соответственно, в скрещиваниях, где один родитель является гетерозиготой с фенотипом TF, а у другого родителя представлен фенотип af, полное проявление рецессивных гомозигот может определяться, в том числе наличием генов-модификаторов, расположенных в мутантной  $X^*$  хромосоме. Различная степень проявления мутантного аллеля в гомозиготном состоянии в разных вариантах скрещиваний была показана для признаков окраски меха (Belyaev *et al.*, 1981). В нашем случае удалось выявить факторы, оказывающие влияние на дефицит особей с фенотипом af среди потомков в одном из вариантов скрещивания.

Так как изменчивость жевательной поверхности верхних моляров копытных леммингов сосредоточена в задней их части (Агаджанян, 2009, Бородин, 2009, Маркова, 2013), изученная фенотипическая изменчивость anterior lobe M1 открывает совершенно новое направление изменчивости не только у представителей этого рода, но и во всем подсемействе Arvicolinae. Мутации, которые способствуют появлению ранее не известных фенотипических структур зубов, имеют принципиальное значение для эволюции таксонов. (Hulsey *et al.*, 2020).

Как показано в настоящей работе, atypical form anterior lobe M1 распространена в популяциях из различных регионов и встречается на разных фазах популяционного цикла. По данным других авторов, в выборках нулевого-четвертого поколений из лабораторных колоний копытных леммингов с Полярного Урала (66°47' с.ш., 65°49' в.д.) и из Якутии, окр. Текси (71°06' с.ш., 129°18' в.д.) частота особей с фенотипом af (только морфотип 2.3A) составила ~3% и 1% (Markova., Smirnov, 2018). Все

это позволяет говорить о полиморфизме anterior lobe первого верхнего моляра (M1) у леммингов рода *Dicrostonyx*.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящей работе описано очень редкое, ранее неизвестное явление — полиморфизм anterior lobe первого верхнего моляра (M1) у леммингов рода *Dicrostonyx*. Полиморфизм этого признака находится в стадии становления, обладает существенным эволюционным потенциалом и открывает новое направление эволюционных преобразований жевательной поверхности коренных зубов в подсемействе Arvicolinae.

По нашим данным высокая плотность популяции может приводить к повышению частоты сложных морфотипов фенотипа af anterior lobe M1 *Dicrostonyx*, т.е. к усилению выраженности этого признака.

В скрещиваниях TF × af полное проявление рецессивных гомозигот видимо определяется, в том числе наличием генов-модификаторов, расположенных в мутантной X\* хромосоме.

Представляет особый интерес оценка частоты встречаемости полиморфизма anterior lobe первого верхнего моляра у леммингов рода *Dicrostonyx* в природных популяциях различных регионов.

**Благодарности.** Автор благодарит анонимных рецензентов за важные замечания.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН 122021000094-3.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Агаджанян А.К. Мелкие млекопитающие плиоцен—плейстоцена Русской равнины. М.: Наука, 2009. 676 с.
- Балахонов В.С., Данилов А.Н., Лобанова Н.А., Чибиряк М.В. Изучение динамики численности мелких млекопитающих на юге Ямала // Материалы по истории и современному состоянию фауны севера Западной Сибири. Челябинск, 1997. С. 43–59.
- Бородин А.В. Определитель зубов полевок Урала и Западной Сибири (поздний плейстоцен—современность). Екатеринбург: УрО РАН, 2009. 100 с.
- Громов И.М., Поляков И.Я. Фауна СССР. Млекопитающие. Т. 3. Вып. 8. Л.: Наука, 1977. 502 с.
- Денисенко А.М. Годовая динамика численности леммингов (*Lemmus sibiricus* и *Dicrostonyx vinogradovi*) на острове Врангеля // Животный мир острова Врангеля. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1986. С. 109–113.
- Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. С. 132–135.
- Маркова Е.А. Оценка сложности щечных зубов полевок (Arvicolinae, Rodentia): ранжированный морфотипический подход // Зоол. журн. 2013. Т. 92. № 8. С. 968–980.
- Abramson N.I., Lissovsky A.A. Subfamily Arvicolinae // The mammals of Russia: a taxonomic and geographic reference / Eds Pavlinov I.Y., Lissovsky A.A. M.: KMK Sci. Press, 2012. P. 220–276.
- Belyaev D.K., Ruvinsky A.O., Trut L.N. Inherited activation-inactivation of the star gene in foxes: its bearing on the problem of domestication // J. Hered. 1981. V. 72. № 4. P. 267–274.
- Fedorov V.B., Fredga K., Jarrell G.H. Mitochondrial DNA variation and the evolutionary history of chromosome races of collared lemmings (*Dicrostonyx*) in the Eurasian Arctic // J. Evol. Biol. 1999. V. 12. № 1. P. 134–145.
- Fredga K. Aberrant chromosomal sex-determining mechanism in mammals, with special reference to species with XY females // Phil. Trans. R. Soc. Lond. 1988. B 322. P. 83–95.
- Fredga K. Bizarre mammalian sex-determining mechanisms // The differences between sexes / Eds Short R.V. and Balaban E. Cambridge Univ. Press. 1994. P. 419–431.
- Fredga K., Fedorov V., Jarrell G., Jonsson L. Genetic Diversity Arctic Lemmings // Ambio. 1999. V. 28. № 3. P. 261–269.
- Gileva E.A. Meiotic drive in the sex chromosome system of the varying lemming, *Dicrostonyx torquatus* Pall. (Rodentia, Microtinae) // Heredity. 1987. V. 59. № 3. P. 383–389.
- Hulsey C.D., Cohen K.E., Johanson Z., Karagic N., Meyer A., Miller C.T., Sadier A., Summers A.P., Fraser G.J. Grand challenges in comparative tooth biology // Integrative and comparative biology. 2020. V. 60. № 3. P. 563–580. <https://doi.org/10.1093/icb/icaa038>
- Kozielska M., Weissing F.J., Beukeboom L.W., Pen I. Segregation distortion and the evolution of sex-determining mechanisms // Heredity. 2010. V. 104. № 1. P. 100–112. <https://doi.org/10.1038/hdy.2009.104>
- Marangoni P., Charles C., Tafforeau P., Laugel-Haushalter V., Joo A., Bloch-Zupan A., Klein O.D., Viriot L. Phenotypic and evolutionary implications of modulating the ERK-MAPK cascade using the dentition as a model // Scientific reports. 2015. V. 5. № 1. P. 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep11658>
- Markova E., Smirnov N. Phenotypic diversity arising from a limited number of founders: A study of dental variation in laboratory colonies of collared lemmings, *Dicrostonyx* (Rodentia: Arvicolinae) // Biol. J. Linn. Soc. 2018. V. 125. P. 777–793. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/bly172>



## Phenotypic Variation and Inheritance of an Atypical form of the Anterior Lobe of the M1 of Collared Lemmings (*Dicrostonyx*, Rodentia, Arvicolinae)

M. I. Cheprakov<sup>#</sup>

*Institute of Plant and Animal Ecology, RAS, Yekaterinburg, 620144 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: Cheprakov@ipae.uran.ru*

Anterior lobe M1 is a conservative element of the chewing surface not only in collared lemmings (*Dicrostonyx*), but also in the entire subfamily Arvicolinae. Description of deviations from the typical shape of the anterior lobe M1 *Dicrostonyx* and the determination of the nature of their inheritance on material from laboratory colonies is described in the work. The phenotypes of the atypical form differ in the degree of complexity. Individuals with an atypical anterior lobe shape are recessive homozygotes. Which phenotype recessive homozygotes realize may depend on various factors, such as the litter number or the frequency of males in the family. Probably, these factors can interact in their influence on the frequency of manifestation of recessive homozygotes. The polymorphism of the studied trait has a significant evolutionary potential and opens up a new direction of evolutionary transformations of the chewing surface of molars in the Arvicolinae subfamily.

*Keywords:* variation, inheritance, atypical form of the anterior lobe of the M<sup>1</sup>, collared lemming, *Dicrostonyx*

УДК 576.895.122(262.5)

## ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ТРЕМАТОДЫ *Maritrema misenense* В ЧЕРНОМ МОРЕ

© 2022 г. Ю. В. Белоусова<sup>®</sup>ФИЦ “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН”, пр. Нахимова, 2, Севастополь, 299011 Россия  
<sup>®</sup>E-mail: julls.belousova@gmail.com

Поступила в редакцию 08.10.2020 г.

После доработки 03.11.2020 г.

Принята к публикации 20.12.2020 г.

В настоящей работе описан жизненный цикл трематоды *Maritrema misenense* (Palombi, 1940) (Prévoit, Bartoli, Deblock, 1976). Спороцисты *M. misenense*, содержащие церкарий, обнаружены в пищеварительной железе гастропод *Rissoa membranacea* (J. Adams, 1800) и *Melarhaphé nereitoides* (Linnaeus, 1758) (syn. *Littorina nereitoides*). Метацеркарии обнаружены в мышцах амфипод *Gammarus insensibilis* (Stock, 1966), а взрослые особи *M. misenense* собраны из кишечника хохлатой чернети *Aythya fuligula* (Linnaeus, 1758). Приведены морфологическое описание, иллюстрации и промеры всех обнаруженных жизненных стадий трематоды.

**Ключевые слова:** Trematoda, *Maritrema*, Microphallidae, жизненный цикл, Черное море

**DOI:** 10.31857/S1026347022050043

Microphallidae (Travassos, 1920) — большое и широко распространенное семейство трематод, представители которого паразитируют в кишечнике большинства классов позвоночных (Deblock, 2008), но наиболее многочисленны среди птиц и млекопитающих. Жизненные циклы микрофаллид включают брюхоногих моллюсков, в основном морских и солоноватоводных, в качестве первых промежуточных хозяев, и ракообразных в качестве вторых промежуточных хозяев.

Нами у черноморских моллюсков у берегов Крыма ранее зарегистрированы личинки рода *Gynaecotyla* (Yamaguti, 1939) семейства Microphallidae (Belousova, 2021).

Жизненный цикл трематоды *M. misenense* в Черном море полностью не был описан, имеются лишь описания личиночных стадий трематоды от разных хозяев (Долгих, 1965). Последние данные по заражению партенитами и метацеркариями трематод *M. misenense* представлены в работах А.В. Долгих (1965) и Т.Н. Мордвиновой (1980)

Отсутствие сведений о жизненном цикле, а также данных по морфологии метацеркарий и марит трематод этого рода в Черном море определило цель нашего исследования.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор проб моллюсков *Rissoa membranacea* проводили в июле 2013 г. в бухте Казачья (44°36'29" N, 33°35'54" E), а гастропод *Melarhaphé nereitoides* в

акватории Батилимана (44°25'5.00" N, 33°41'1.00" E) в марте 2017 г. Методом полного гельминтологического вскрытия (Быховская—Павловская, 1969) исследовано 75 экз. гастропод *R. membranacea* и 69 экз. *M. nereitoides*. Найденных партенит исследовали живыми с помощью икроскопа Olympus CX41, оснащенного фотокамерой CX50 с программным обеспечением Infinity Analyze, метаграммным обеспечением Infinity Analyze, метацеркарий и марит — фиксированными: окрашивали ацетокармином по стандартной методике, степень окраски дифференцировали “железной водой” (H<sub>2</sub>O + Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) и подкисленным спиртом (70%-ный этанол + 3%-ная HCl); после дегидратации в этаноле различной концентрации (70, 80, 90 и 100°) и просветления в гвоздичном масле трематод заключали в канадский бальзам (Роскин, Левинсон, 1957). Промеры проведены на живых и фиксированных гельминтах. Экскреторную систему церкарий исследовали на живых особях при подкрашивании личинок нейтральным красным, в результате чего наблюдалось мерцание пламенных клеток. Для каждого морфологического параметра вычисляли среднее арифметическое со стандартной ошибкой (μm).

Показатели инвазии партенитами моллюсков составили: в *R. membranacea* экстенсивность инвазии (ЭИ) — 1%, интенсивность инвазии (ИИ) — 21 экз./особь, индекс обилия (ИО) — 0.28 ± 0.28; в *M. nereitoides*, ЭИ — 1%, ИИ — 25 экз./особь, ИО — 0.01 ± 0.01 соответственно.



**Рис. 1.** Микрофотография партениты с эмбрионами церкарий *Maritrema misenense* от моллюсков *Rissoa labiosa* из акватории бухты Казачья. Масштабная линейка 50  $\mu\text{m}$ .

По данным Т.Н. Мордвиновой, показатели зараженности метацеркариями амфипод *G. insensibilis* составили ЭИ – 4%, ИИ – 2 экз./особь (Мордвинова, 1980)

Также были изучены препараты № 1274. Tr.3j.v1, 1275. Tr.3j.v2, 1277. Tr.3j.v4, 1278. Tr.3j.v5 и № 1276. Tr.3j.v3, 1279 Tr.3j.v6 метацеркарий сем. Microphallidae от гаммарусов *G. insensibilis* подколлекции паразитических организмов Коллекции гидробионтов Мирового океана ФИЦ ИнБЮМ и препараты № 1280. Tr.3j.v.7–16 марит *M. misenense* от хохлатой чернети *A. fuligula* (<http://marineparasites.org/>). На наличие гельминтов был исследован один экз. хохлатой чернети *A. fuligula* в кишечнике которой были отмечены взрослые особи *Maritrema misenense*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установлено, что трематода *Maritrema misenense* в акватории Севастополя (Черное море) характеризуется трехксенным жизненным циклом, в котором первым промежуточным хозяином выступают брюхоногие моллюски *R. membranacea* и *M. nereitoides*, вторым промежуточным – гамма-



**Рис. 2.** Микрофотография живой церкарии *Maritrema misenense* от моллюсков *Rissoa labiosa* из акватории бухты Казачья: 1 – стилет, 2 – ротовая присоска, 3 – брюшная присоска, 4 – железы проникновения, 5 – выделительный пузырь. Масштабная линейка 50  $\mu\text{m}$ .

русы *G. insensibilis*, окончательным – хохлатая чернеть *A. fuligula*

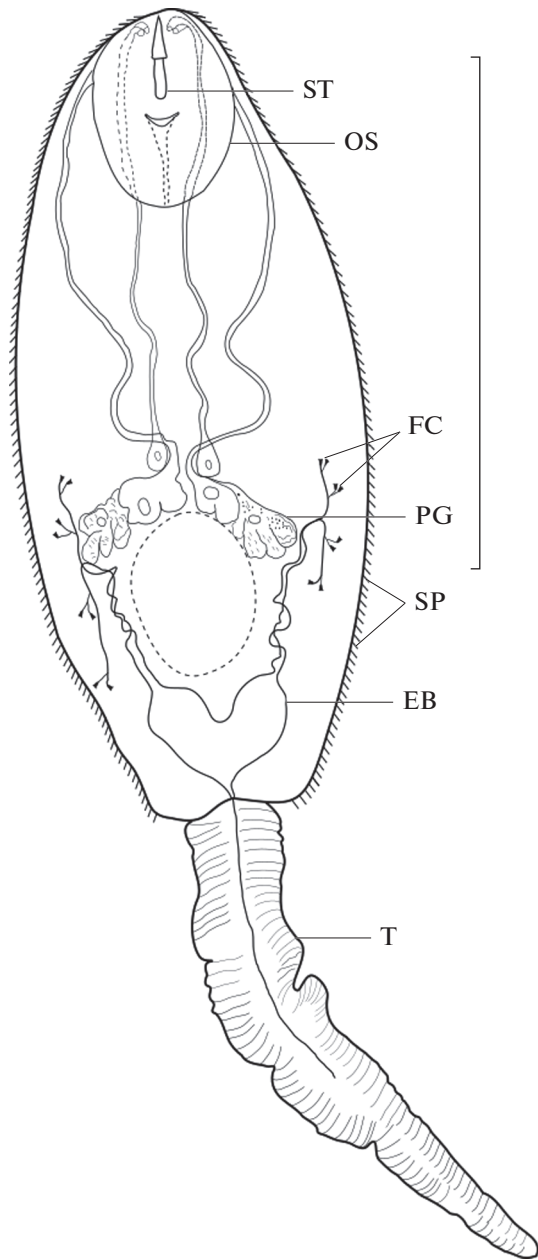
Приводим морфологические описания особей каждой жизненной стадии *M. misenense*.

**Спороцисты** (рис. 1). Овальной формы, содержат 15–30 зрелых церкарий. Длина спороцист 80–150  $\mu\text{m}$ . Родильная пора не обнаружена.

**Церкарии** (рис. 2, 3). Описание и промеры церкарий сделаны на основе 6-ти живых личинок. Мелкие ксифидоцеркарии имеют удлиненное тело, сплющенное в дорсо-вентральном направлении. Длина тела  $80 \pm 3 \mu\text{m}$  при ширине  $51 \pm 3 \mu\text{m}$ . Ротовая присоска, имеет размер  $20 \pm 2 \times 18 \pm 1$ , субтерминальная. Брюшная присоска ( $10 \pm 1 \times 9 \pm 0.8 \mu\text{m}$ ) в 2 раза меньше ротовой и расположена посередине тела трематоды. Ротовая присоска снабжена стилетом размером  $13 \pm 1 \mu\text{m}$  цилиндрической формы. Коническая часть стилета немного короче ( $5 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ), чем его основание (рис. 2).

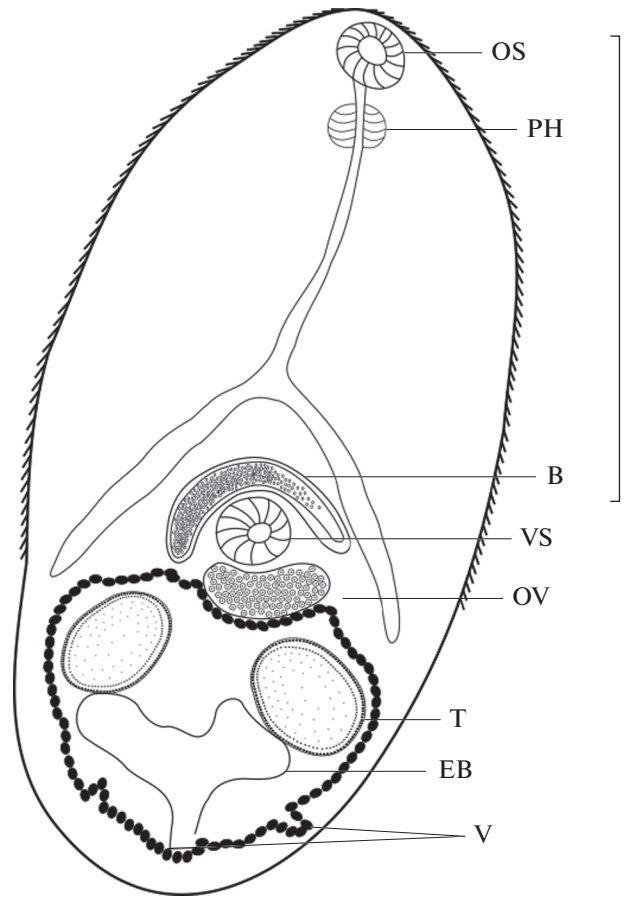
Четыре пары желез проникновения открываются в передней части тела. Каналы желез открываются парами в области ротовой присоски (рис. 2). Железы проникновения, заполненные гранулированными включениями, достигают уровня брюшной





**Рис. 3.** Живая церкария *Maritrema misenense* от моллюсков *Melarhaphe nereitoides* в акватории Батилимана: ST – стилет; OS – ротовая присоска; VS – брюшная присоска; EB – мочевой пузырь; FC – пламенные клетки; PG – железы проникновения; T – хвост, SP – шипики. Масштабная линейка 50  $\mu\text{m}$ .

присоски. Одноклеточные железы крупных размеров. Границы между клетками плохо выражены. Протоки желез представлены извитыми каналами. Пищеварительная система не развита. Восемь пар протонефридий сгруппированы в задней части тела, в результате чего формула выделительной системы выглядит таким образом  $2[(2+2)+(2+2)] = 16$ . Экскреторный мочевой пузырь сердцевидной формы, открывается наружу.

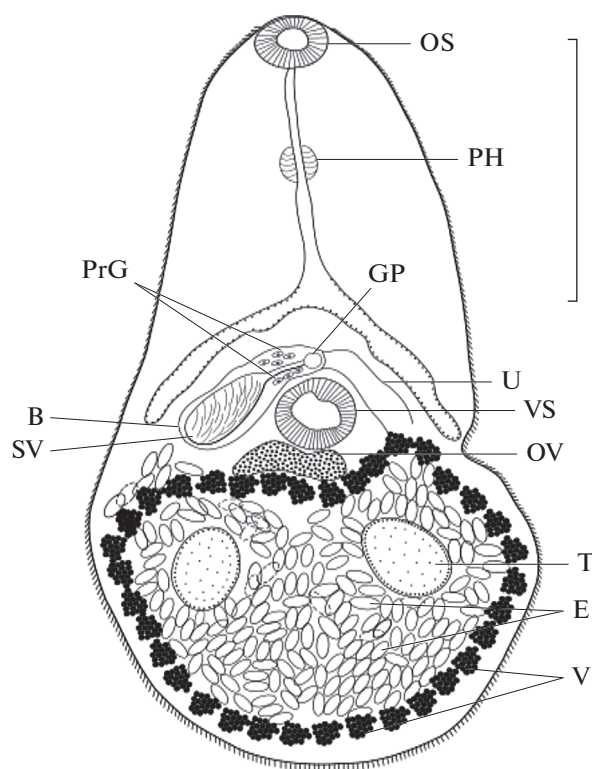


**Рис. 4.** Метациркария *Maritrema misenense* от гаммаруса *Gammarus insensibilis* (б. Казачья): OS – ротовая присоска; PH – фаринкс; VS – брюшная присоска; EB – мочевой пузырь; T – семенник; OV – яичник; B – половая бурса; V – желточники. Масштабная линейка 100  $\mu\text{m}$ .

Наша находка церкарии по всем параметрам совпадает с морфологическим описанием церкарии *C. misenensis* из акватории Черного моря, сделанном А.В. Долгих (1965): грушевидная форма тела, гладкая структура vs ребристой структуры хвоста у других представителей семейства Microphallidae, положение и форма стилета.

**Метациркарии** (рис. 4). Метациркарии ( $n = 10$ ) *M. misenense* паразитируют в мышцах амфипод *G. insensibilis*.

Тело метациркарий покрыто шипиками. Длина тела метациркарий  $177 \pm 8 \mu\text{m}$ , ширина –  $100 \pm 4 \mu\text{m}$ . Ротовая и брюшная присоски почти равны по размеру. Диаметр ротовой присоски  $15 \pm 1 \times 18 \pm 1 \mu\text{m}$ , брюшной –  $18 \pm 1 \times 17 \pm 1 \mu\text{m}$  соответственно. Ротовая присоска субтерминальная, брюшная расположена посередине тела трематоды. Префаринкс размером  $8 \pm 3 \mu\text{m}$ , фаринкс круглой формы  $10 \pm 1 \times 11 \pm 2 \mu\text{m}$ . Ветви кишечника заходят за задние края брюшной присоски. Семенники располагаются симметрично, позади яичника. Семен-



**Рис. 5.** Марита *Maritrema misenense* из кишечника хохлатой чернети (бухта Омега): OS – ротовая присоска; PH – фаринкс; VS – брюшная присоска; T – семенник; OV – яичник; B – половая бурса; SV – семенной пузырек; PrG – простатическая часть; GP – половая пора; U – матка; V – желточники; E – яйца. Масштабная линейка 200  $\mu\text{m}$ .

ники цельнокрайние, не перекрываются маткой. Длина левого семенника  $23 \pm 3 \mu\text{m}$  при ширине  $21 \pm 3 \mu\text{m}$ , правого семенника  $22 \pm 4 \mu\text{m}$  при ширине  $18 \pm 2 \mu\text{m}$ . Половая бурса, размером  $35 \pm 5 \times 6 \pm 0.2 \mu\text{m}$ . Семенной пузырек на препарате не просматривается. Яичник лежит поперечно под брюшной присоской. Длина яичника составляет  $10 \pm 0.4 \mu\text{m}$ , ширина  $19 \pm 4 \mu\text{m}$ . Половая бурса мощная. Желточники образуют кайму в задней части тела трематоды.

**Марита** (рис. 5). У берегов Крыма хохлатая чернеть известна как пролетная, зимующая и летнекочующая. Встречается как во внутренних водоемах, так и в прибрежных морских акваториях. Хохлатая чернеть регулярно зимует у берегов Севастополя (Бескаравайный, 2012). Мачкевским В.К. (2010) взрослые особи трематоды *M. misenense* ( $n = 10$ ) зарегистрированы в кишечнике хохлатой чернети *A. fuligula* (Linnaeus, 1758).

Тело обнаруженных марит трематод вытянутое, слегка сужено на уровне брюшной присоски. Длина тела  $549 \pm 8$ , ширина –  $234.7 \pm 10 \mu\text{m}$ . Tegument покрыт шипиками. Ротовая и брюшная присоски почти равны по размеру. Диаметр ротовой

присоски  $38 \pm 1 \times 41 \pm 1 \mu\text{m}$ , брюшной –  $40 \pm 3 \times 47 \pm 3 \mu\text{m}$  соответственно. Ротовая присоска субтерминальная и расположена посередине тела трематоды. Префаринкс длинный размером  $45 \pm 6 \mu\text{m}$ , фаринкс маленький  $25 \pm 1 \times 26 \pm 0.7 \mu\text{m}$ . Ветви кишечника заходят за задние края брюшной присоски. Семенники располагаются симметрично, позади яичника. Семенники цельнокрайние, не закрываются маткой. Длина левого семенника  $59 \pm 2 \mu\text{m}$  при ширине  $38 \pm 2 \mu\text{m}$ , правого семенника  $59 \pm 3 \mu\text{m}$  при ширине  $40 \pm 2 \mu\text{m}$ . Половая бурса, размером  $105 \pm 7 \times 28 \pm 2 \mu\text{m}$ , содержит семенной пузырек, который заполняет  $2/3$  бурсы. Поперечный лопастный яичник лежит под брюшной присоской. Длина яичника составляет  $51 \pm 5 \mu\text{m}$ , ширина  $37 \pm 6 \mu\text{m}$ . Желточники образуют кайму в задней части тела трематоды.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Впервые церкарии *M. misenense* были обнаружены Паломби в акватории Средиземного моря (Капо Мизено) у моллюсков *Cerithium vulgatum* (Bruguière, 1792) (Palombi, 1940). Этот же вид церкарий отмечали у двух видов гидробий *Hydrobia ulvae* (Pennat, 1777) и *H. ventrosa* (Montagu, 1803) у берегов Дании (Ankel, 1962) и в акватории Ливорно (Sordi, 1959). Морфологическое описание церкарий *M. misenense* из акватории Черного моря представлено в работе А.В. Долгих (1965) под названием *C. misenensis* от моллюсков *Tritia reticulata* (Linnaeus, 1758) (syn. *Nassa reticulatum* Linnaeus, 1758).

Исследованные в настоящей работе церкарии от черноморских моллюсков *Hydrobia acuta* по основным диагностирующим признакам (размеру, форме мочевого пузыря, хвоста, включая конфигурации стилета) схожи с церкариями *Cercaria misenensis* от моллюсков *Cerithium vulgatum* из акватории Средиземного моря (Palombi, 1940). Форма стилета найденных нами личинок также схожа с формой стилета особей рода *Maritrema*, ранее описанных в литературе (Prevot et al., 1976; Галактионов, Добровольский, 1998; Galaktionov, Dobrovolsky, 2003).

Сведения о микрофаллидных метацеркариях, паразитирующих у черноморских ракообразных, немногочисленны. Так, Мордвиновой Т.Н. в 1980-х гг. проведено единственное комплексное исследование гельминтофауны ракообразных (Мордвинова, 1980) и автором отмечено паразитирование метацеркарий *Maritrema* у 5 видов ракообразных: *Gammarus insensibilis*, *G. aequicauda* (Martynov, 1931), *G. subtypicus* (Stock, 1966), *Idotea balthica* (Pallas 1772), *Sphaeroma serratum* (Fabricius, 1787).

В это же десятилетие Прево с коллегами (Prevot et al., 1976) опубликовали работу, в которой дал подробное описание метацеркарий трематод рода *Maritrema* от амфипод *Orchestia mediterranea* (Costa,

1853) в акватории Средиземного моря. Анализируя морфологические характеристики и рисунки средиземноморских метацеркарий и метацеркарий, исследованных нами в настоящей работе от гаммарусов, очевидна принадлежность средиземноморских и черноморских особей к одному и тому же виду трематод, *Maritrema misenense*.

В Черном море до настоящего времени были зарегистрированы мариты 5 видов рода *Maritrema* — *M. oocysta* (Lebour, 1907), *M. subdolum*, *M. echinocirratum* (Leonov, 1958), *M. opisthometra* (Leonov, 1958), *M. gratiosum* (Nicoll, 1907) (Скрябин, 1952; Смогоржевская, 1976).

Последние данные о численности взрослых особей микрофаллидных трематод от водоплавающих птиц Севастопольских бухт получены в 2010 г. (регистрационный код отчета 0106U001630) Отдела экологической паразитологии, ИнБЮМ В.К. Мачкевским (Мачкевский, 2010). В работе автора были представлены первичные данные по видовому составу и показателям зараженности околотовных птиц микрофаллидными трематодами. Согласно данным В.К. Мачкевского, представители рода *Maritrema* были обнаружены у кряквы в акватории бухты Казачья с экстенсивностью инвазии 80%, и акватории бухты Омега с ЭИ — 34% соответственно.

Особенности описанной выше взрослой особи семейства Microphallidae можно обобщить следующим образом: овальной формы тело покрыто мелкими шипиками, ротовая и брюшная присоски практически одинаковых размеров, длина префаринкса практически соответствует длине пищевода, кишечные ветви достигают переднего края или середины брюшной присоски, объемный уирус, сильный и извитой семявыводящий проток, желточники обратхуют замкнутое кольцо. Все эти особенности определяют принадлежность описанных нами особей к семейству Microphallidae, в частности к виду *Maritrema misenense*.

Жизненный цикл *M. misenense* в Средиземном море впервые описал Паломби (Palombi, 1940). Согласно его данным первым промежуточным хозяином является *Cerithium lividulum* (Risso, 1826) (syn. *Cerithium mediterraneum* Deshayes, 1843, вторым — амфипода *Orchestia mediterranea* (Costa, 1853), а дефинитивным хохлатая чернеть *Aythya fuligula*. Наши исследования показали, что в акватории Черного моря для трематоды *Maritrema misenense* первым промежуточным хозяином является брюхоногий моллюск *Hydrobia acuta*; вторым — амфипода *Gammarus insensibilis*; а естественным окончательным хозяином — хохлатая чернеть *Aythya fuligula*.

Таким образом, наша работа дает полное морфологическое описание основных стадий развития трематоды *M. misenense* в акватории Черного моря и демонстрирует, что жизненный цикл *M. misenense*

полностью реализуется в исследуемых нами биоценозах и протекает аналогично средиземноморскому.

**Благодарности.** Автор выражает благодарность Т.Н. Мордвинову за сбор и приготовление тотальных препаратов личинок трематод от амфипод *Gammarus insensibilis*; В.К. Мачкевского за сбор и приготовление тотальных препаратов марит от околотовных птиц севастопольских бухт и М. Макарова за помощь в сборе и определении видового состава черноморских моллюсков.

**Конфликт интересов:** автор рукописи заявляет об отсутствии конфликта интересов

**Этические нормы.** Это исследование было проведено в соответствии с этикой и благополучием животных. Все исследования выполнялись в соответствии с Законом о ветеринарной и медицинской деятельности и Национальным законом о защите животных.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ им. А.О. Ковалевского РАН (тема 121030100028-0).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бескаравайный М.М.* Птицы Крымского полуострова. Симферополь: Бизнес-информ, 2012. 57 с.
- Быховская—Павловская И.Е.* Паразитологическое исследование рыб. Ленинград: Наука, 1969. 108 с.
- Галактионов К.В., Добровольский А.А.* Происхождение и эволюция жизненных циклов трематод. Санкт-Петербург: Наука, 1998. 404 с.
- Долгих А.В.* Личинки трематод паразиты моллюсков крымского побережья Черного моря: Автореферат дис. ... канд. биол. наук: Севастополь-Львов, 1965. 24 с.
- Мачкевский В.К.* Видовая структура сообществ и параметры популяции паразитов околотовных птиц в условиях естественной неоднородности параметров их среды обитания в азово-черноморском регионе // Отчет НИР “Изучение механизмов адаптации и трансформации паразитарной составляющей морских прибрежных сообществ в условиях неоднородности среды и антропогенного влияния”. № госрегистрации 0106U001630. Раздел 2. 2010. С. 50–59.
- Мордвинова Т.Н.* Гельминтофауна высших ракообразных крымского побережья и северо-западной части Черного моря: Автореф. дис. канд. биол. наук Москва, 1980. 24 с.
- Роскин Г.И., Левинсон Л.Б.* Микроскопическая техника: учеб. пособие для вузов. Под ред. Г.И. Роскина. 3-е изд. М.: Совет. Наука, 1957. 466 с.
- Смогоржевская А.А.* Гельминты водоплавающих и болотных птиц фауны Украины. Киев: Наукова думка, 1976. 416 с.
- Скрябин К.И.* Трематоде животных и человека. Основы трематодологии. Том VI. Изд. Акад. наук СССР. М., 1952. 689 с.

- Ankel F. *Hydrobia ulvae* (Pennat, 1777) und *Hydrobia ventrosa* (Montagu, 1803) Als Wirte larvaler Trematoden. // Meddr Dansk Naturh. Form. 1962. № 124. P. 1–100.
- Belousova Y.V. Life cycle of the Trematode *Gynaecotyla adunca* (Trematoda: Microphallidae) in the Black Sea // Biol Bull Russ Acad Sci. 2021. V. 48. P. 561–568.
- Galaktionov K.V., Dobrovolskij A.A. The biology and evolution of trematodes: an essay on the biology, morphology, life cycles, transmissions, and evolution of digenetic trematodes. / Kluwer Academic Publishing. London, 2003. 594 p.
- Deblock S. Family Microphallidae Ward, 1901 // Keys to the Trematoda. V. 3 / Eds In: Bray R.A., Gibson D.I., Jones A.; London: CABI, Wallingford, and Natural History Museum, 2008. P. 451–492.
- Palombi A. Gli stadi larvali dei trematodi del Golfo di Napoli // Rivista di parassitologia. 1940. V. 4. P. 7–30.
- Prevot G., Bartoli P., Deblock S. Cycle biologique de *Maritrema misenensis* (Palombi, 1940) n.comb. (Trematoda: Microphallidae Travassos, 1920) du Midi de la France // Ann. Parasitol. Hum. Compare. 1976. V. 51. P. 433–446.
- Sordi M. Ricerche sulla biologia delle acque salmastre del Livornese. Trematodi parassiti di *Paludedestrina salinasi* (Aradas et Calcara, 1842) // Monit. zool. ital. 1959. V. 66.

## Life Cycle of the Trematode *Maritrema misenense* (Trematoda: Microphallidae) in the Black Sea

Y. V. Belousova<sup>#</sup>

*Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Nakhimov av., 2, Sevastopol, 299011 Russia*

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

The life cycle of the trematode *Maritrema misenense* (Palombi, 1940) Prévot, Bartoli & Deblock, 1976. Sporocysts *M. misenense* containing cercariae were found in the digestive gland of the gastropods *Rissoa membranacea* (J. Adams, 1800) and *Melarhaphé nereitoides* Linnaeus, 1758 (syn. *Littorina nereitoides*). Metacercariae were recorded in the muscles of the amphipods *Gammarus insensibilis* Stock, 1966, while adult *M. misenense* was collected from the digestive tract of the near-water birds *Aythya fuligula* (Linnaeus, 1758). The morphological description, illustrations and measurements of all detected vital stages of the trematodes are given.

**Keywords:** Trematoda, *Maritrema*, Microphallidae, life cycle, Black Sea

УДК 57.022

## ЭТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ АППАРАТА ДВИЖЕНИЯ КОСТИСТЫХ РЫБ (НА ПРИМЕРЕ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ *Oncorhynchus mykisswalbaum*)

© 2022 г. В. П. Панов\*, @, С. С. Сафонова\*, @@, И. В. Байдаров\*

\*ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, ул. Тимирязевская, 49, Москва, 127550 Россия

@E-mail: panovval@gmail.com

@@E-mail: Sfalij@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.01.2021 г.

После доработки 15.06.2021 г.

Принята к публикации 17.06.2021 г.

В настоящей работе приводятся данные об особенностях структурных адаптационных изменений в соматической мускулатуре радужной форели на различных этапах раннего постнатального онтогенеза. Развитие соматической мышечной системы непосредственно связано с локомоторными поведенческими актами рыб. В предличиночный период происходит подготовка слаборазвитых мышц к поднятию на поверхность воды и наполнению плавательного пузыря воздухом. Личиночный период характеризуется выраженными плавательными движениями, сопровождающимися активное экзотенное питание. Мальки приобретают локомоторные свойства, присущие ювенальным особям с хорошо развитой мускулатурой.

**Ключевые слова:** радужная форель, постнатальный онтогенез, этологические особенности, мышечная ткань

**DOI:** 10.31857/S1026347022040114

Форма тела молоди рыб непосредственно после выхода из икры и относительно короткий период после этого существенно отличается от взрослых особей. Ее трансформация лежит в прогрессивном изменении морфометрических пропорций с увеличением размеров рыб (Snyder *et al.*, 1977; Соорер, 1978a, 1978b; Fuiman, 1979; Панов и др., 2020). Изменения в строении тела рыб связаны с дифференцировкой относительного роста (Fuima, 1983). У большинства видов рыб эмбрионы, близкие к вылуплению, не имеют ротового отверстия, кишечника, ануса, жабр и других органов (Sampaio *et al.*, 2015; Marques *et al.*, 2017; Faustino *et al.*, 2018).

Ряд онтогенетических исследований посвящен внешней и внутренней морфологии молоди рыб (Balart, 1985; Watson, 1987; Potthoff *et al.*, 1988). Способность к поимке живой добычи, особенно при первом трофическом акте, зависит от размеров при вылуплении, остроты зрения, характера плавательных способностей личинок рыб, а также доступности жертвы (Jing *et al.*, 2018).

Другие работы посвящены морфологическому состоянию органов питания и локомоции, которые функционально тесно взаимосвязаны (Kohn *et al.*, 1983; Taki *et al.*, 1987; Omori *et al.*, 1996). Рост и развитие личинок рыб в большой степени обуслов-

лены функционированием их опорно-двигательного аппарата. Его активная составляющая – мышечная система, является основой для совершения и смены поведенческих актов, обеспечивает благополучие популяции рыб на ранних стадиях их развития (Панов, 1997).

У личинок дорадо при вылуплении соматическая мускулатура состоит из монослоя тонких недифференцированных под дермой кожи, лежащих эпаксиально и гипаксиально от горизонтальной миосепты волокон. Под ними наблюдаются большего размера полигональные волокна (Ramirez-Zarzosa, *et al.*, 1995). У костистых рыб миогенезиницируется на более ранних стадиях эмбриогенеза, чем у амниот, таких как птицы и млекопитающие.

Это обусловлено потребностью генерировать пропульсивное плавание у личинок рыб (Johnston *et al.*, 2011). Миогенные предшественники клеток медленных и быстрых мышц пространственно отделяются перед формированием сомитов на стадии гастрюляции (Hirsinger *et al.*, 2004).

Рост скелетной поперечнополосатой мускулатуры обусловлен двумя процессами: гипертрофией и гиперплазией. У молоди эти процессы происходят постоянно, а у взрослых особей костистых рыб постепенно затухают и, прежде всего, это касается

гиперплазии (Carpene, Veggetti, 1981; Rowleron *et al.*, 1985; Ramirez-Zarzosa *et al.*, 1998).

Методы определения количественных показателей, таких как диаметры и общая площадь волокон в репрезентативных областях соматической мускулатуры различных возрастных и размерных групп рыб использованы во многих работах (Weatherley *et al.*, 1988; Kiessling *et al.*, 1991; Alami-Durante *et al.*, 1997; Johnston *et al.*, 1998; Valente *et al.*, 1999; Panov *et al.*, 2019).

В период раннего постнатального онтогенеза ручьевой форели и американского гольца выделяется ряд стадий, связанных с изменением морфометрических показателей тела рыб. В это же время у личинок отмечены начало внешнего питания и повышение локомоторной активности (Панов и др., 2020). Эти важные этапы в жизни молоди рыб находятся в соответствии с подготовленностью (созреванием) и морфофункциональным состоянием соматической мышечной системы, которая обеспечивает их успешность.

Целью настоящего исследования является установление особенностей структурных адаптационных изменений в соматической мускулатуре на различных этапах раннего постнатального онтогенеза радужной форели.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись свободные эмбрионы (предличинки), личинки и мальки радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*). Этапы развития рыб устанавливали в соответствии с онтогенетическими взглядами. Расса (1946). Икра на стадии глазка размещалась в один слой в деревянных лотках с сетчатым дном. Лотки находились в емкостях установки замкнутого цикла водообмена (УЗВ). Их полезный объем – 200 л. Установка в своем составе имела блоки механической и биологической очистки, охлаждения и ультрафиолетового обеззараживания воды, аэрации и озонирования. Частичную подмену воды (не более трети объема) производили дважды в неделю. Температура воды при инкубации икры составляла +6°C, увеличиваясь по мере развития рыб до +16°C. Содержание растворенного в воде кислорода поддерживали в пределах 6–9 мг/л.

С момента перехода на смешанное питание и до полной резорбции желточного мешка молодь кормили живыми науплеусами артемии (*Artemiasalina*) и замороженным циклопом. В дальнейшем рыба потребляла промышленный гранулированный комбикорм Gouessant T-Salmo (протеин – 42%, жир – 24%).

С началом активных локомоций рыб перемещали из лотков в аквариумы. Наблюдения за поведением рыб осуществляли в течение 2 ч в утреннее и вечернее время три раза в неделю и в течение 3 ч в

дневное время – два раза в неделю. Для оценки этологических особенностей молоди применяли методы свободного наблюдения и сплошного протоколирования (Попов, Ильченко, 1990).

Длину тела рыб определяли с помощью бинокулярного микроскопа МБС – 2, снабженного окуляром с измерительной шкалой с точностью до 0.1 мм, а массу – поштучно с использованием аналитических электронных весов “Sartorius” (точность до 0.1 мг).

С целью гистологического анализа из каждой возрастной группы рыб отбирали по 3 особи (в одной пробе). За период исследований отобрано 15 проб (7 – на этапе предличинки; 6 – на этапе личинки и 2 – на мальковом). Пробы фиксировали в 10%-ном формалине. После промывки образцов от фиксатора проточной водой осуществляли их проводку через растворы желатина восходящих концентраций (7, 12.5 и 25%), после чего заливали в 25%-ный желатин и после его застывания вырезали блоки. Для уплотнения среды в течение суток блоки выдерживали в 25%-ном формалине. Делали тотальные поперечные срезы тела на уровне начала спинного плавника. Гистологические образцы толщиной 15 мкм получали на замораживающем микротоме с электрическим приводом МЗП-01 Техном, оснащенный охладителем ОМТ 28-02 Е. Окраска образцов осуществляли Суданом III (“Вектон”, Россия) и гематоксилином по Карацци (Абрис+, Россия). Для исследования полученных препаратов использовали световой микроскоп Микромед С-1 с объективами 4/0.10 160/0.17; 10/0.25 160/0.17 и S40/0.65 160/0.17. На них определяли диаметр белых гликолитических (быстрых) и красных окислительных (медленных) мышечных волокон и их плотность (Аппельт, 1959). Красные и белые волокна дифференцировались по среднему диаметру, интенсивности окраски и расположению миофибрилл. Микрофотографии получали с помощью фотоаппарата Sony Cyber-shot и обработаны с использованием программы “Microsoft PowerPoint”.

Расчет соотношения красной и белой мускулатуры на тотальном поперечном срезе осуществлялся с помощью графической программы ImageJ.

Полученный материал обработан статистически с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel. Рассчитывали такие показатели как среднее абсолютное значение со стандартной ошибкой средней ( $M \pm m$ ), коэффициент вариации ( $Cv, \%$ ). Достоверность различий определял  $t$  по  $t$ -критерию Стьюдента при  $p \leq 0.05$  (по Пирсону).



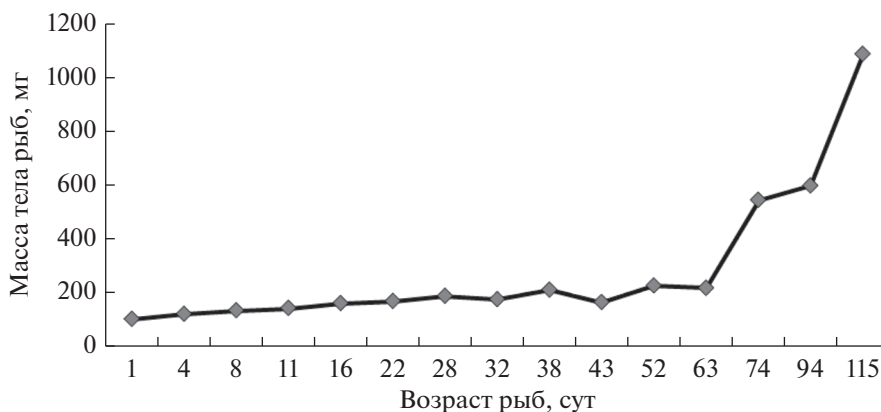


Рис. 1. Динамика роста массы тела рыб.

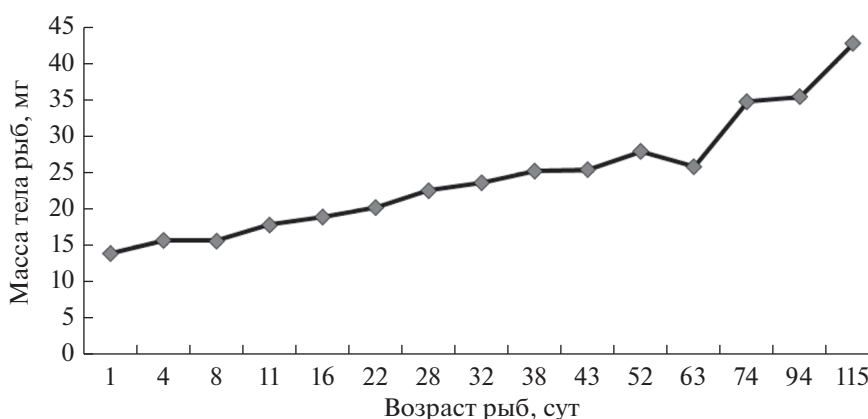


Рис. 2. Динамика линейного роста рыб.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Химический состав воды на протяжении всего экспериментального периода находился в пределах допустимых норм. Рост массы и длины рыб представлены на рис. 1 и 2. Особенность роста массы рыб в раннем постнатальном онтогенезе рыб связана с наличием желточного мешка, его резорбцией и переходом молоди сначала на смешанное, а затем и экзогенное питание. После расходования запасных питательных веществ, на последних этапах личиночного периода и мальков их рост становится более интенсивным (рис. 1).

Рост рыб в длину происходит постоянно и постепенно без резких колебаний (рис. 2).

Соматическая мускулатура, составляющая основу аппарата движения, при онтогенетическом развитии выполняет локомоторную функцию и обеспечивает индивидуальное благополучие рыб. Она определяет многие жизненные функции, связанные с развитием респираторного, пищеварительного аппаратов, ухода от хищников и др. Ранний постнатальный онтогенез включает три этапа развития: предличиночный, личиночный и

мальковый (рис. 3–5). В каждом из них происходят изменения в структуре мышечной ткани, которые связаны с определенным типом поведения (табл. 1).

Односуточные предличинки обладают большим желточным мешком овальной формы, плотно прижатой к нему головой, и крупными глазами. В желточном мешке хорошо видны жировые капли. Позади головы находится хорошо выраженный грудной плавник с лепидотрихиями. Относительно небольшое, слабо развитое тело с окаймляющей плавниковой складкой, в задней части которой наметились лепидотрихии хвостового плавника.

Прогрессивное развитие предличинки заключается в уменьшении объема желточного мешка, который по мере резорбции приобретает несколько уплощенную форму, и обособлении головы. В возрасте 11 сут (71.0 градусо-день с момента начала выклева; объем желточного мешка — 73.2% от исходного) появляются зачатки спинного и анального плавников с лепидотрихиями. Плавниковая складка постепенно редуцируется. У 22-х суточной молоди желточный мешок приобретает угловатую форму,

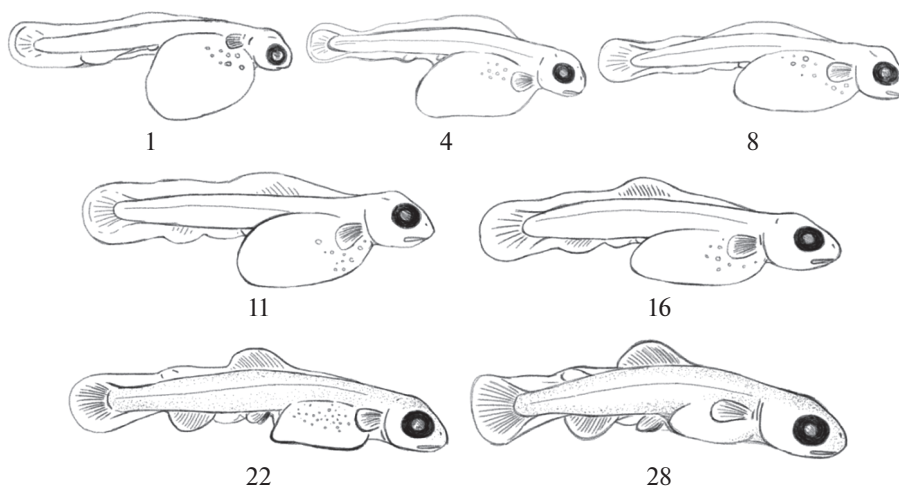


Рис. 3. Развитие радужной форели в предличиночный период (1–28-е сут с момента выклева).

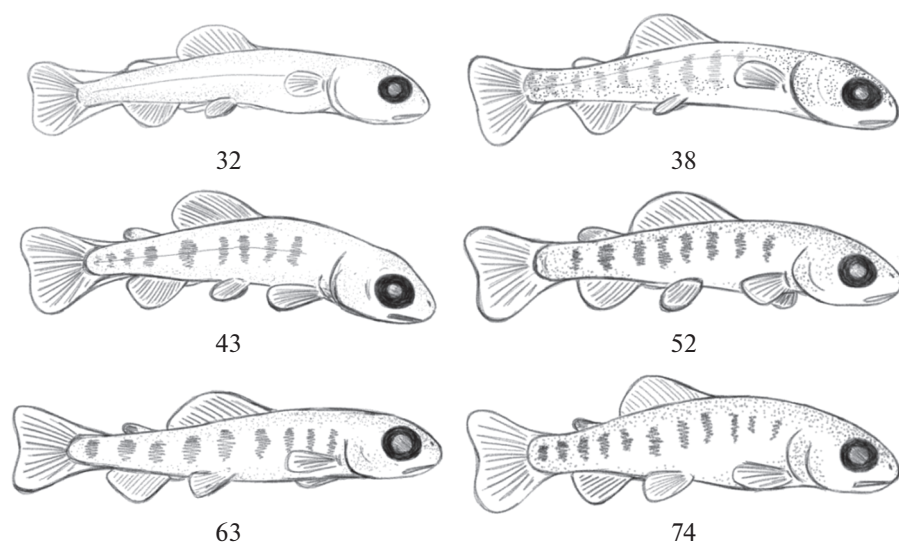


Рис. 4. Развитие радужной форели в личиночный период (32–74-е сут с момента выклева).

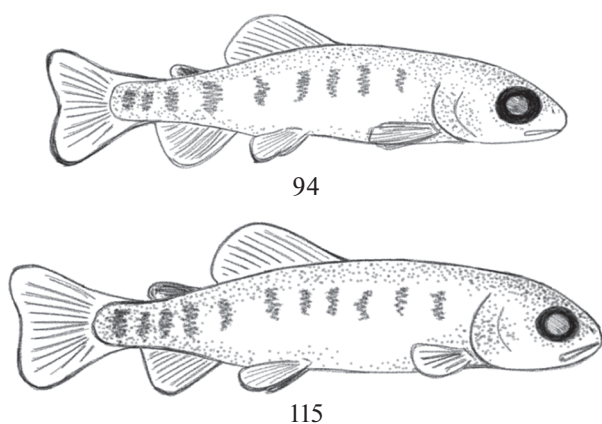


Рис. 5. Развитие радужной форели в мальковый период (94–115-е сут с момента выклева).

а позади него заметны зачатки брюшных плавников (155.0 градусо-дней; остаток желточного мешка – 27.2%). В конце предличиночного периода, в 28 суточном возрасте желточный мешок практически исчезает (204.5 градусо-дней; остаток – 5.3% от исходного объема), но остаются элементы плавниковой складки в области хвостового стебля и небольшого участка между брюшными и анальным плавником (рис. 3).

В предличиночный период (с 1 по 28 сутки) наблюдается постепенное увеличение диаметров белых мышечных волокон (в 2.4 раза) ( $P < 0.05$ ). Коэффициент вариации достаточно высокий и, в среднем, составляет 25.6% (пределы колебания 2.3–21.0 мкм). Наиболее интенсивный рост быстрых волокон происходит вначале постнатального



Таблица 1. Поведенческие особенности радужной форели

Дата отбора проб	Возраст рыб, сутки	Описание
14.05.19	1	За несколько дней до начала выклева эмбрионы активно двигались внутри икринок. После выхода из оболочки первые свободные эмбрионы не совершали локомотий, были заметны только колебательные движения грудными плавниками с целью аэрации жаберного аппарата
17.05.19	4	Рыбы, выклюнувшиеся на 4-е – 7-е сутки после первых особей, проявляли большую двигательную активность, чем вышедшие из оболочки самыми первыми и на 2-е – 3-и сутки. Личинки совершают периодические червеобразные движения, хотя в основном лежат на боку
21.05.19	8	Предличинки совершают периодические перемещения по дну лотков рывками. Лежат не только на боку, но и на желточном мешке (на брюшной стороне тела)
24.05.19	11	Объем желточного мешка – 73.2%. Передвижения по дну стали более плавными, предличинки не лежат на боку, а опираются на желточный мешок, поддерживая тело в характерном для рыб положении
29.05.19	16	Объем желточного мешка – 61.9% от исходного. Начинается «роение» - молодь располагается в лотках концентрическими кругами, ориентируясь головами в одном направлении (чаще всего – по часовой стрелке)
04.06.19	22	Объем желточного мешка – 27.2% от исходного. Заметны единичные «свечки». Продолжается «роение». Периодически рыбы делают движения вперед и вверх, после чего снова опускаются на дно, сохраняя строение «роя»
10.06.19	28	Объем желточного мешка – 5.3% от исходного. Некоторые особи осуществляют поднятие «на плав». Поднимаясь к поверхности воды, они заглатывают воздух, чтобы наполнить им плавательный пузырь. Начало кормления (артемия, циклоп, стартовый корм). Рыба на корм реагировала слабо. Корм захватывали только те рыбы, которые поднялись на плав, но не активно. Лежащие на дне особи никак на него не реагировали
14.06.19	32	Начало пигментации спинного плавника. Поднятие на плав стало массовым, повысился и интерес рыб к корму
20.06.19	38	Активное экзогенное питание. Личинки располагаются по всей толще воды и держатся против течения. При кормлении захватывают пищу из толщи воды. На корм с поверхности и со дна не реагируют
25.06.19	43	Продолжается рост рыб. Становится более яркой характерная для молоди лососевых окраска – вертикальные темные полосы на теле. Наблюдаются проявления хищнического поведения – рыбы конкурируют за частицы корма и место, совершая резкие рывки в сторону соперника, пытаясь его укусить
04.07.19	52	Начало каннибализма. Появляются рыбы, у которых изо рта торчат хвосты съеденных ими более мелких особей. При этом чаще всего погибали и агрессоры, и их жертвы, поскольку никто из них не мог высвободиться. Рыбы были распределены по трем размерным группам, каждая группа отсажена в отдельный аквариум
15.07.19	63	Активный каннибализм. Несмотря на проведенную сортировку, неравномерный рост рыб приводит к возобновлению каннибализма. Рыбы становятся очень агрессивными по отношению друг к другу, заметны повреждения спинных и хвостовых плавников
26.07.19	74	Каннибализм продолжается. Проведена вторая сортировка. Начало кормления крупкой. Парные и анальный плавники окрашены в оранжевый цвет. На брюшных и анальном плавниках – белый кант. У самых крупных особей появляется чешуя
15.08.19	94	Чешуя присутствует у всех размерных групп. Агрессивное поведение и каннибализм в одноразмерных группах. Появление радужного блеска на чешуе
05.09.19	115	Агрессия уменьшилась, мальки повреждают друг другу только спинные плавники. Рыбы равномерно распределены по всей толще воды в направлении против течения

**Таблица 2.** Характеристика мускулатуры радужной форели в предличиночный период

Возраст рыб, сутки	Белая мускулатура (n = 150)		Красная мускулатура (n = 30)		Плотность белой мускулатуры (n = 30)	
	диаметр волокон, мкм	CV, %	диаметр волокон, мкм	CV, %	% / 1 мм <sup>2</sup>	CV, %
1	$5.7 \pm 0.12$ 2.3–9.2	25.6	$1.2 \pm 0.06$ 0.8–2.1	29.5	$35.5 \pm 1.60$ 26.0–57.8	24.6
4	$7.4 \pm 0.20^*$ 2.5–16.8	33.2	$1.3 \pm 0.07$ 0.8–2.2	29.3	$40.4 \pm 1.73^*$ 29.1–60.6	23.4
8	$7.8 \pm 0.21^*$ 2.5–15.5	32.3	$1.3 \pm 0.14$ 0.4–3.4	58.7	$41.7 \pm 0.84^*$ 32.4–51.2	11.0
11	$8.0 \pm 0.17^*$ 4.2–12.6	26.0	$1.7 \pm 0.11^*$ 0.8–2.9	36.6	$40.8 \pm 1.09^*$ 31.7–57.5	14.6
16	$10.7 \pm 0.22^*$ 5.0–18.1	25.0	$1.9 \pm 0.14^*$ 0.9–3.4	40.7	$57.5 \pm 1.65^*$ 45.5–75.9	15.8
22	$11.4 \pm 0.20^*$ 6.3–16.8	21.4	$2.0 \pm 0.11^*$ 1.3–3.5	29.4	$63.6 \pm 2.46^*$ 46.4–98.5	21.2
28	$13.6 \pm 0.18^*$ 8.4–21.0	15.9	$3.4 \pm 0.16^*$ 1.6–5.0	25.7	$74.6 \pm 2.48^*$ 49.7–91.2	18.2
В среднем за период	9.2	25.6	1.8	35.7	50.6	18.4

Примечание. \* – Разность значений между первыми сутками после выклева и последующими возрастными достоверна при  $P \leq 0.05$ . Здесь и в табл. 3, 4: при расчете плотности белой мускулатуры учитывали только зрелые волокна. Над чертой – абсолютные средние значения и ошибка; под чертой – пределы колебаний.

онтогенеза с 1 по 4 сут (на 22.7%) и с 16 до 28 сут (на 27.1%) (табл. 2).

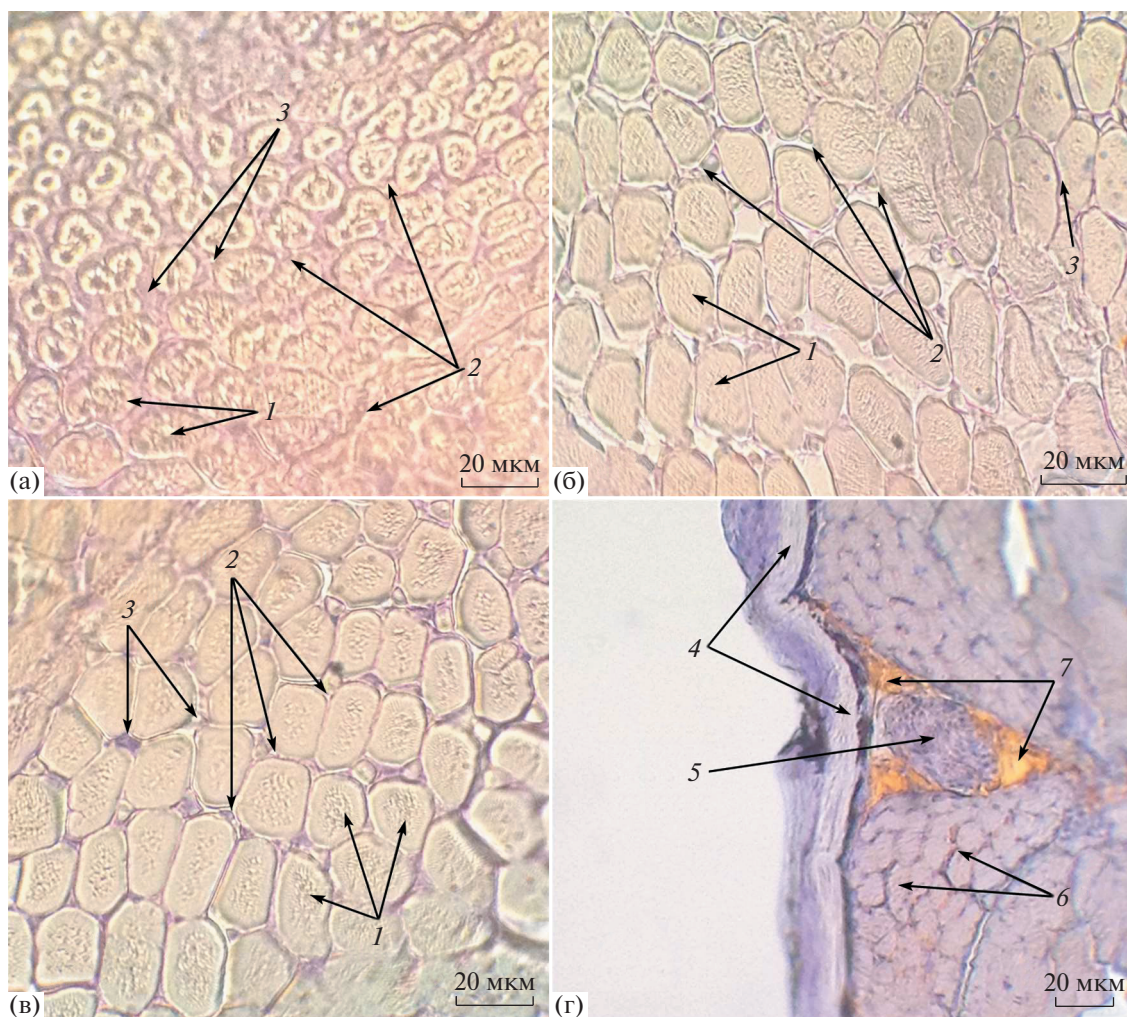
Белые мышечные волокна, угловатые по форме, находятся на достаточно большом расстоянии друг от друга. Наименьшая их плотность (менее 40%) у односуточной молодежи. Соединительно-тканые прослойки (эндомизий) широкие, разделяют одно волокно от другого. По мере развития рыб плотность быстрых мышечных волокон повышается и достигает в конце периода 74.5% ( $P < 0.05$ ). При этом прослойки эндомизия сужаются и волокна сближаются (рис. 6а, 6б).

Размеры красных мышечных волокон существенно меньше, чем белых (в среднем, в 5.1 раза) ( $P < 0.05$ ). Медленные волокна по размерам еще более неоднородны ( $CV = 37.5\%$ ), чем быстрые. Среди них встречаются в различные возрастные периоды очень мелкие волокна в 8–10 раз меньше, чем самые крупные. Диаметр медленных волокон с 1 по 28 суток увеличивается в 2.8 раза, особенно интенсивно в последнюю декаду (на 78.9%) ( $P < 0.05$ ). В целом, у предличинок форели рост белых и красных мышц связан с процессами гипертрофии. Площадь красной мускулатуры мала,

поэтому не представляется возможным оценить объективно плотность волокон, ее образующих.

На рис. 7а показано распределение быстрых волокон в соответствии с их диаметрами. Основной группой у предличинок с 1 по 11 сут являются волокна с классовым промежутком 5–10 мкм (70–77%). В дальнейшем с 16 до 28 суточного возраста модальным классом становятся волокна размером 10–15 мкм (45–73%). Появляются также более крупные волокна с диаметром 15–22 мкм (8–23%). Доля самых мелких волокон (2–3 мкм) уменьшается от 25% (1 сут) до 0 (16 сут).

Миогенез быстрых волокон происходит постепенно и в каждой возрастной стадии развития соответствует определенным структурным и морфометрическим изменениям. В первые сутки, когда предличинки лежат неподвижно, быстрые волокна тонкие, их плотность незначительна (35.5%). В процессе метаморфоза происходят хорошо выраженные (4 сут), затем менее заметные (4–11 сут) увеличение диаметров и плотности мышечных волокон, которые используются для кратковременных быстрых движений. При подготовке рыб к более активной локомоции (16–28 сут) интенсивность роста мышечных волокон существенно



**Рис. 6.** Мускулатура радужной форели. (а): белая мускулатура предличинки (4-е сут после выклева), (б) – белая мускулатура поздней предличинки (28 сут), (в) – белая мускулатура личинки (43 сут), (г) – красная мускулатура малька (94 сут). 1 – зрелые белые волокна; 2 – молодые белые волокна; 3 – эндомизий; 4 – эпидермис; 5 – блуждающий нерв; 6 – зрелые красные волокна; 7 – липоциты. Увеличение: 600×.

повышается (роение, свечки и переход на плав). Таким образом, наблюдается характерная гипертрофия быстрых волокон, обеспечивающая молодежи быстрые и резкие движения.

В красных мышцах явной гипертрофии не наблюдается, поскольку в середине предличиночного периода, с 8 до 11 сут, отмечена хорошо выраженная гиперплазия. Количество самых мелких волокон существенно увеличивается (с 16 до 50%), что характерно для начала постнатального развития (44%). В конце этого периода (22 сут) мелкие полностью исчезают и появляются крупные волокна (4.0–5.5 мкм), доля которых составляет ~30% (рис. 7б). Рост медленных мышц можно определить как неравномерный, чередующихся гипертрофии и гиперплазии. В период с 1 до 8 сут при пропульсивных движениях диаметр медленных мышечных волокон фактически не изменяется.

Из-за слабо развитой красной мышцы выполнение основной ее функции продолжительного плавания проблематично. Ее доля от поперечного среза тела в области спинного плавника невелика и в среднем составляет 2.4% (рис. 8). Продолжением предличиночного периода до его окончания является рост красной мышцы за счет гипертрофии волокон. Это связано с процессом формирования красных мышц во время роения и поднятия на плав молодежи для продолжительного медленного плавания при невысоких скоростях.

Во время личиночного периода, на поздних стадиях развития молодежь приобретает форму, подобную взрослым рыбам. Она имеет хорошо развитые парные и непарные плавники, респираторные органы и ротовой аппарат. Наблюдается полное отсутствие желточного мешка и переход личинок на экзогенное питание. На теле появляется специ-

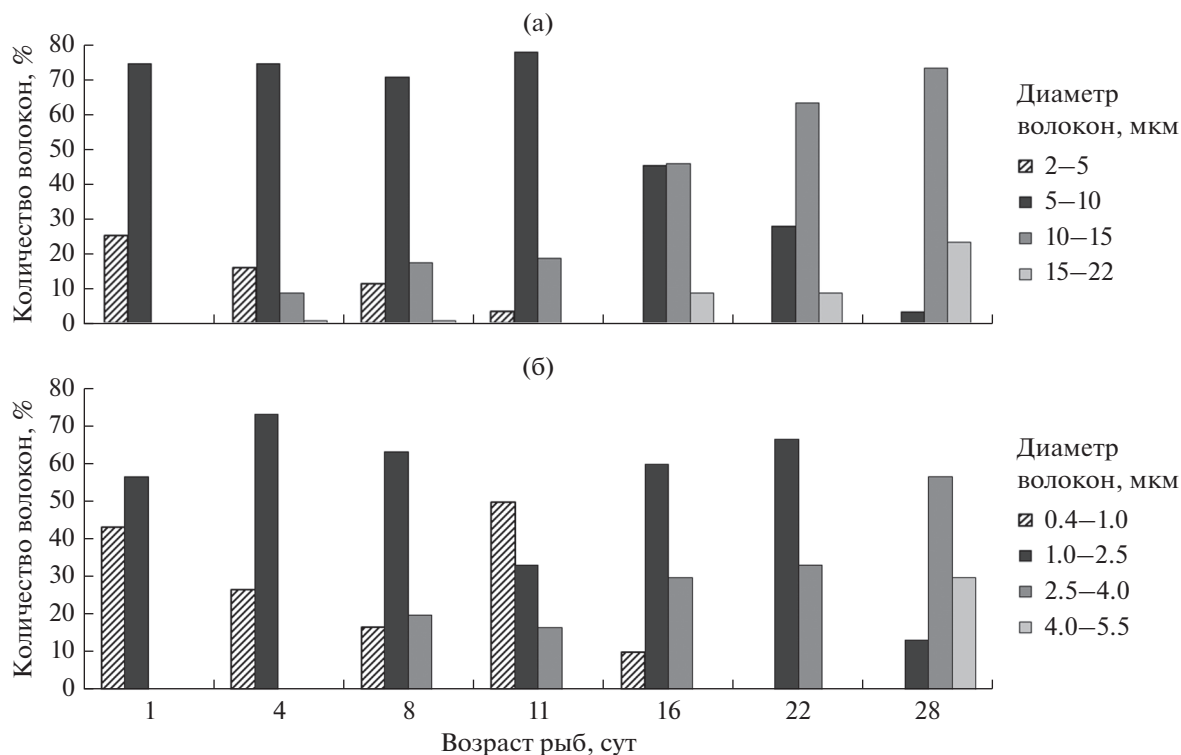


Рис. 7. Распределение диаметров зрелых белых (а) и красных (б) волокон в предличиночный период.

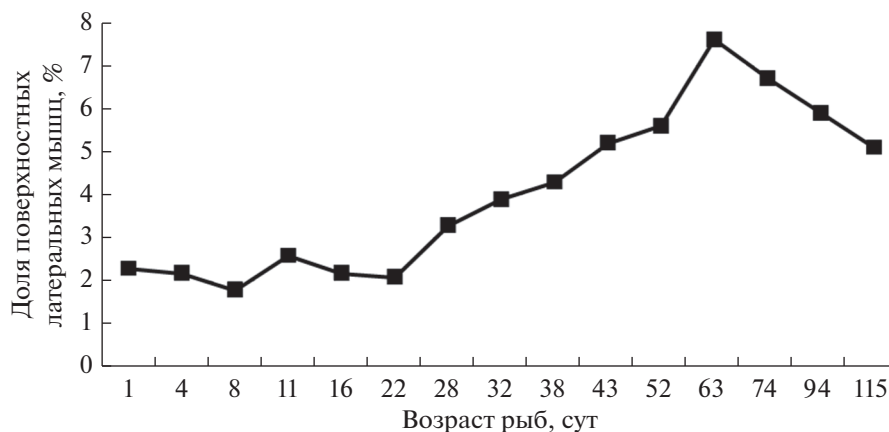


Рис. 8. Доля красных мышц (в % от поперечного среза тела рыб).

фическая пигментация, характерная для радужной форели, однако чешуйный покров еще отсутствует. Аппарат движения функционально относительно хорошо развит. У личинок осевая соматическая мускулатура, как и у предличинок, представлена в основном белыми мышцами. На протяжении двух декад (возраст 32–52 сут; 247.5–483.5 градусо-дней с момента выклева) наблюдается постепенное увеличение размеров быстрых волокон ( $P < 0.05$ ). В последующие 10 сут размеры

волокон существенно уменьшаются (на 9.5%) ( $P < 0.05$ ). Однако личиночный период (74 сут; 815.5 градусо-дней) заканчивается хорошо выраженной гипертрофией белых волокон и их высокой плотностью по сравнению с предыдущими возрастными группами рыб. Плотность волокон повышается до 88% особенно на 74 сутки постнатального развития (в среднем за период 77.8%). Аналогичная динамика роста волокон характерна также для красных мышц личинок. Варибель-

**Таблица 3.** Характеристика мускулатуры радужной форели в предличиночной период

Возраст рыб, сутки	Белая мускулатура (n = 150)		Красная мускулатура (n = 30)		Плотность белой мускулатуры (n = 30)	
	диаметр волокон, мкм	CV, %	диаметр волокон, мкм	CV, %	%/1 мм <sup>2</sup>	CV, %
32	$15.0 \pm 0.26$ 7.1–21.8	21.0	$4.4 \pm 0.30$ 1.7–7.1	37.7	$80.2 \pm 2.22$ 49.9–99.8	16.6
38	$15.1 \pm 0.22$ 8.3–22.3	17.7	$4.8 \pm 0.27$ 1.7–7.3	30.9	$77.7 \pm 1.75$ 61.1–98.8	12.3
43	$15.4 \pm 0.27$ 4.3–22.5	21.6	$4.6 \pm 0.31$ 2.5–8.4	36.8	$73.5 \pm 1.43^*$ 63.6–84.8	10.7
52	$15.8 \pm 0.28^*$ 6.3–26.9	21.5	$6.3 \pm 0.32^*$ 2.1–9.7	27.2	$73.1 \pm 2.10^*$ 55.3–88.5	15.7
63	$14.3 \pm 0.20^*$ 5.9–18.9	16.8	$4.7 \pm 0.31$ 2.1–8.8	36.6	$73.9 \pm 1.54^*$ 63.9–91.2	11.4
74	$17.6 \pm 0.37^*$ 6.2–28.1	25.7	$7.0 \pm 0.52^*$ 2.5–12.6	40.3	$88.3 \pm 1.57^*$ 68.6–96.1	9.7
В среднем за период	15.5	20.7	5.3	34.9	77.8	12.7

Примечание. \* – Разность значений между 32 сут после выклева и последующими возрастами достоверна при  $P \leq 0.05$ .

ность морфометрических показателей мышечной ткани у личинок ниже по сравнению с предличинками (табл. 3).

На протяжении большей части личиночного периода (32–63 сут) модальным классом являются волокна с диаметром 15–20 мкм (52–58%), определяющие их средние размерные показатели. В возрасте 63 сут существенно возрастает доля более мелких волокон (10–15 мкм) и их средний диаметр несколько уменьшается. В финальную стадию в белых мышцах молоди увеличивается количество крупных волокон с классовыми промежутками 20–25 мкм (35%) и 25–30 мкм (4%), что приводит к гипертрофии мышечной ткани (рис. 9а).

Для красных мышц характерно чередование гипертрофии и гиперплазии мышечных волокон. Наибольшая доля мелких волокон (1.5–3.0 мкм) отмечено у 32-х суточных рыб (26%). Очередное пополнение мелкими волокнами наблюдается у личинок в возрасте 63 сут. В конце личиночного периода доля этих волокон снижается до 6% и на смену им приходят более крупные 7–10 мкм и 10–13 мкм, доля которых возрастает до 30 и 20% соответственно (рис. 9б).

Вторая половина личиночного периода связана с ростом мышечной системы. Радужная форель является плотоядным по своей природе видом. Ее молодь уже на стадии личинки отличается склонностью к хищничеству посредством каннибализма. Для этого рыбы совершают резкие

рывки в сторону своих сверстников, нанося им не только повреждения спинных и хвостовых плавников, но и практически полностью их заглатывая. В соответствии с подобным поведением, для схватывания жертвы необходима хорошо развитая белая мускулатура с большим количеством сократительных элементов в виде миофибрилл, что обеспечивает увеличение размера волокон. Для постоянных продолжительных локомоций, которыми также обладают личинки форели, красные мышцы играют важную роль. Их рост связан непосредственно с чередующимися процессами гипертрофии и гиперплазии. Доля красных мышц у личинок по сравнению с предличинками увеличивается и в среднем составляет от поперечного среза тела 5.6% (рис. 8). Конечным итогом личиночного периода является повышение роли гипертрофии мышечных волокон.

В мальковый период продолжается увеличение размеров как белых, так и красных волокон (табл. 4). Гипертрофический рост в белых мышцах обусловлен повышением доли быстрых волокон классов 25–30 мкм (20%) и 30–36 мкм (~4%) (рис. 10а). Плотность белых волокон у мальков несколько ниже (79.9–80.4%), чем у старшей возрастной группы личинок (88.3%). В красных мышцах гипертрофия связана с возрастанием роли крупных медленных волокон класса 13–15 мкм (17 мкм) (рис. 10б). Доля красных мышц по сравнению с личинками несколько уменьшается (рис. 8).



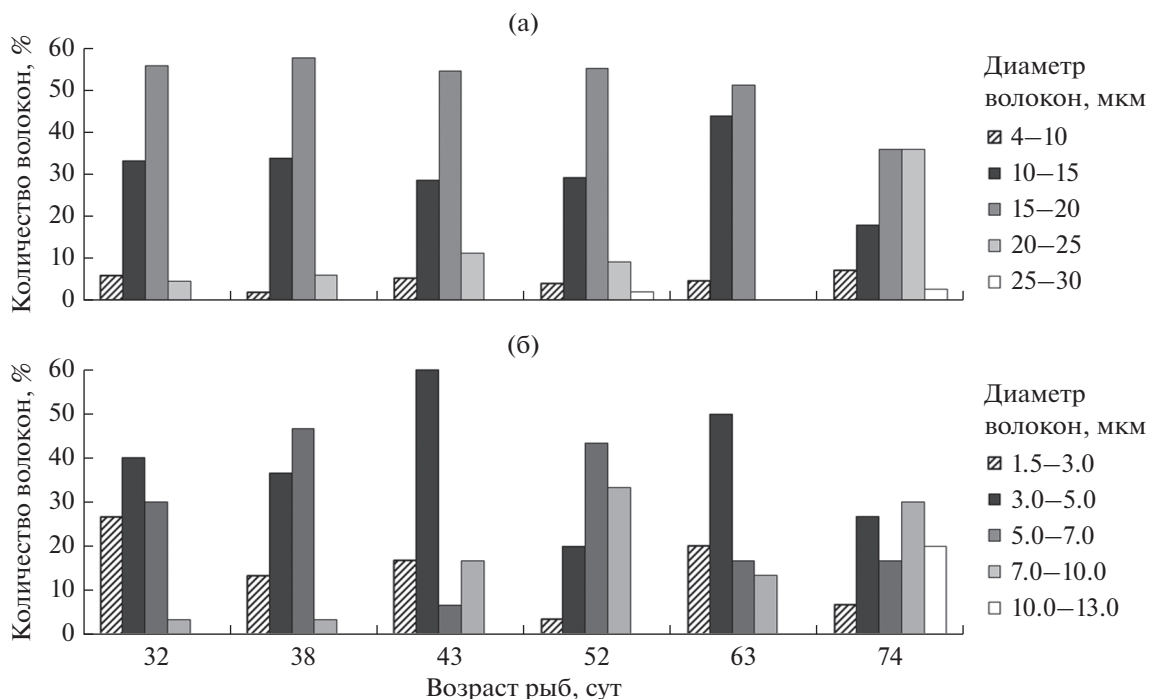


Рис. 9. Распределение диаметров зрелых белых (а) и красных (б) волокон в личиночный период.

У мальков снижается уровень агрессивности, появляется чешуйный покров, осуществляется переход на питание искусственными кормами. В аквариумах рыбы равномерно распределяются по всей толще воды против течения. Мальки стараются удержаться в потоке воды, используя продолжительные усилия, и при необходимости осуществляют броски для схватывания корма. Подобному поведению соответствует, по нашему мнению, степень развития обеих мышечных систем молоди.

Наряду со зрелыми, относительно крупными, в мышцах обоих типов наблюдаются мелкие, вновь образовавшиеся молодые волокна. Молодые волокна имеют округлую форму. На ранних стадиях онтогенеза они имеют темно-синий цвет,

т. к. из-за малого размера заметны в основном за счет окрашивания ядер гематоксилином. В белых мышцах это волокна, имеющие диаметр, в среднем, равный  $1.6 \pm 0.06$  мкм, ( $n = 150$ ) достигают у мальков не более 3 мкм. Они располагаются между крупными быстрыми волокнами. Как правило, каждое молодое окружено тремя и более зрелыми волокнами. Достигая диаметра 3 мкм и более, они приобретают вид зрелых быстрых волокон. Такое сочетание этих структур формирует мозаичную структуру мышечной ткани (рис. 6в). Соотношение зрелых и молодых волокон в период постнатального роста увеличивается в среднем с 1.3 до 2.6. Это свидетельствует о затухании процесса гиперплазии в быстрых мышцах мальков форели.

Таблица 4. Характеристика мускулатуры радужной форели в мальковый период

Возраст рыб, сутки	Белая мускулатура ( $n = 150$ )		Красная мускулатура ( $n = 30$ )		Плотность белой мускулатуры ( $n = 30$ )	
	диаметр волокон, мкм	CV, %	диаметр волокон, мкм	CV, %	%/1 мм <sup>2</sup>	CV, %
94	$20.2 \pm 0.38$ 8.4–31.9	22.9	$9.7 \pm 0.48$ 5.0–13.4	27.0	$80.4 \pm 2.56$ 54.6–98.4	17.4
115	$19.9 \pm 0.45$ 8.0–35.7	27.7	$9.4 \pm 0.53$ 4.6–15.1	31.1	$79.9 \pm 2.17$ 52.9–98.7	14.9
В среднем за период	20.1	25.3	9.6	29.1	80.2	16.2

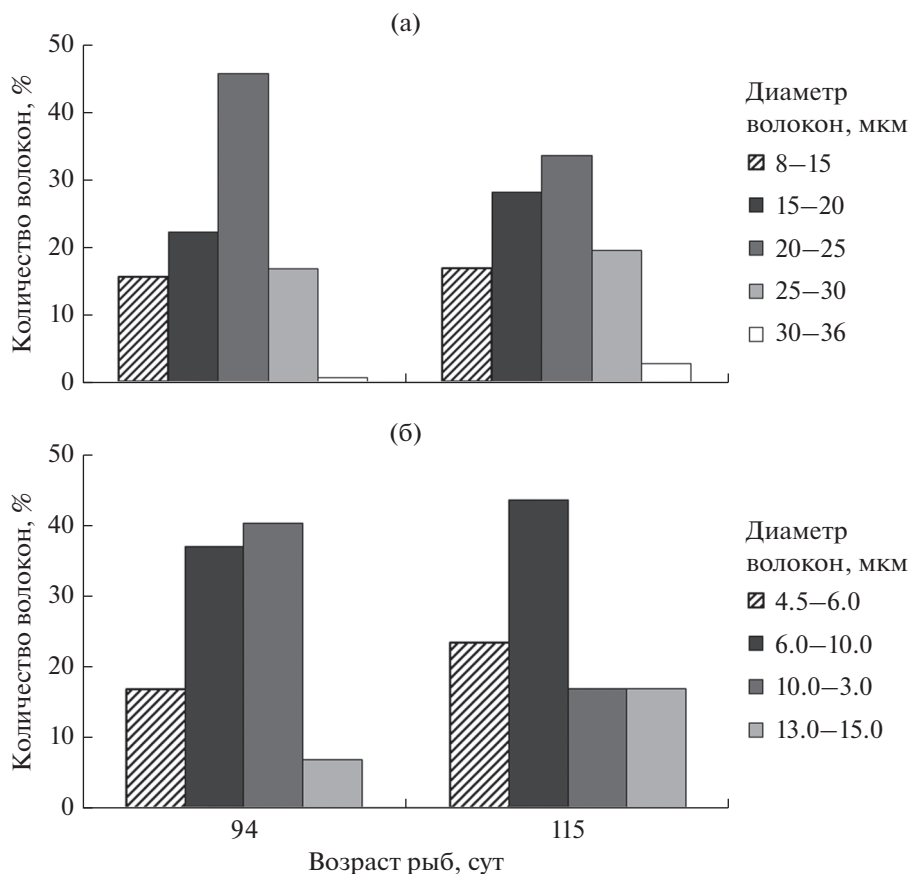


Рис. 10. Распределение диаметров белых (а) и красных (б) волокон в мальковый период.

Аналогичные волокна присутствуют в красных мышцах, однако они очень мелкие ( $<0.1$  мкм) и не поддаются точному измерению при помощи светового микроскопа (рис. 6г).

Морфологическим особенностям и функциональному значению соматических мышц различных видов рыб, в том числе и на ранних стадиях онтогенеза, посвящено большое количество исследований (Boddeke *et al.*, 1959; Лобынцев, 1961; Bone, 1966; Лав, 1976; Van Raamsdonk *et al.*, 1982; Akster, 1985; Наследов и др., 1989. Kilarski, 1990; Mascarello *et al.*, 1995; Rowleron *et al.*, 1995; Панов, Смирнов, 1996).

Наиболее критическими для выживания рыб являются ранние стадии постнатального онтогенеза. Предличиночный период характеризуется подготовкой всей мышечной системы к выполнению тех функций, которые должны быть обеспечены на более поздних этапах развития рыб. В это время мышцы недостаточно готовы в полной мере выполнить возложенные на них функции комплекса быстрых и медленных движений в виде свечек, роения и перехода на постоянное плавание. Раннее развитие структур, связанных с плаванием и питанием являются приоритетным, по-

скольку не только важны при добычи пищевых объектов, но и для избегания хищников (Osse *et al.*, 1997).

Только, что вылупившиеся предличинки опускаются на дно, лежат и могут делать достаточно резкие движения хвостом при стимуляции. Это связано с тем, что на поздних стадиях эмбрионального развития и у только что вылупившихся предличинок мышечные волокна мало содержат сократительных элементов виде миофибрилл. Однако вскоре их объем увеличивается и волокна заполняются тесно упакованным миофибрилярным материалом (Nag, Nursall, 1972; Proctor *et al.*, 1980; Veggetti *et al.*, 1990; Brooks *et al.*, 1995; Ayala *et al.*, 1999). По этой причине, вероятно, и наблюдается четкая пауза гиперплазии непосредственно после вылупления рыб (Gibson, Johnston, 1995; Galloway *et al.*, 1999a, 1999b; Veggetti *et al.*, 1999).

У радужной форели оптомоторный ответ появляется на 10 сут после выклева, что демонстрируется увеличением чувствительности к низкой освещенности, а также появлением двигательных особенностей в это же самое время (Carvalho *et al.*, 2004). По мнению некоторых исследователей, отмечается тесная связь красных мышц с

развитием жабр. Это наталкивает на мысль, что красные волокна выполняют не только локомоторную функцию (El-Fiky *et al.*, 1987).

В личиночный период рыбы переходят полностью на экзогенное питание. Личинки располагаются по всей толще воды и держатся против течения, активно ему сопротивляясь. Продолжительное плавание у молоди данио рерио не происходит до тех пор, пока молодые красные волокна не приобретают метаболические свойства дефинитивных структур, что происходит в течение 7 суток (Van Raamdonk *et al.*, 1982). Кроме того, красные волокна не становятся различимой популяцией до достижения форелью свободно плавающей стадии (Nag, Nursal, 1972).

Мышечная система обеспечивает необходимые функции жизнедеятельности личинок, в том числе каннибализм, который в этом возрасте (63–74 сут) сильно развит (табл. 1). Охота на соплеменников также требует определенных энергетических затрат, прежде всего, связанных с белыми мышцами.

Характерными поведенческими и морфофункциональными особенностями мальков является тесная связь с последующим периодом развития рыб – ювенальным. Агрессия по отношению к другим особям у мальков уменьшается. Рыбы равномерно распределены по всей толще воды в направлении против течения. Мышечный рост в возрасте 115 сут, по нашим данным, определяется в основном гипертрофией. В дальнейшем, по данным других исследователей, наблюдаются видовые различия по вкладу гипертрофии и гипертрофии в процессы роста рыб (Stickland *et al.*, 1988; Vieira, Johnston, 1992; Johnston, 1994). Гипертрофический рост происходит в различные периоды постнатального онтогенеза, в том числе и на ранних стадиях развития рыб (Nathanailides *et al.*, 1995; Alami-Durante *et al.*, 1997).

Гипертрофия характерна для быстрорастущих рыб, особенно у личинок и ювенальных особей (Weatherley, Gill, 1984; Higgins, 1990).

Процессы роста красной мускулатуры у мальков несколько замедляются, что обусловлено рядом причин: а) разрастанием мышц спинного плавника, которые не учитывались при расчетах; б) ростом тела рыб в высоту, в результате чего увеличивается доля эпаксиальных и гипаксиальных порций быстрых мышц. Аналогичные данные получены и по другим видам рыб. Относительная редукция поверхностных боковых мышц имеет место в связи постнатальным развитием карпа (El-Fiky *et al.*, 1987) и нототении (Johnston, Camm, 1987).

\*\*\*

Развитие в раннем постнатальном онтогенезе соматической мышечной системы находится в

непосредственной связи с локомоторными поведенческими актами рыб. В предличиночный период при слаборазвитых мышцах происходит подготовка для совершения таких важных актов как “свечки” для захвата воздуха и заполнения плавательного пузыря, роения и поднятия на плав при участии быстрых и медленных мышечных волокон. В личиночный период при установлении хорошо выраженных плавательных движений повышается роль чередующихся процессов гипертрофии и гипертрофии. Мальки, как переходная стадия, приобретают локомоторные свойства, присущие ювенальным особям с хорошо функционально развитыми белыми гипертрофированными мышцами.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аппельт Г. Введение в методы микроскопического исследования. М.: МЕДГИЗ, 1959. 426 с.
- Лав Р.М. Химическая биология рыб. Пищевая промышленность, 1976. 349 с.
- Лобынцев К.С. Материалы по экологической гистологии туловищной мускулатуры некоторых костистых рыб // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии, 1961. Т. 41. Вып. 11. С. 79–85.
- Наследов Г.А., Скоробовичук Н.Ф., Лебединская И.И. Некоторые проявления функциональной адаптации локомоторной (туловищной) мускулатуры // Физиология морских животных, Апатиты, 1989. С. 135.
- Панов В.П., Смирнов А.Н. Гистологическое строение осевой мускулатуры ротана (*Perccottus glehni* Dyb) // Известия ТСХА, 1996. Вып. 3. С. 191–201.
- Панов В.П., Фалий С.С., Байдаров И.В., Есавкин Ю.И., Золотова А.В. Морфогенез структур ручьевой форели (*Salmotrutta morpha fario*) и американского гольца (*Salvelinus fontinalis*) на ранних стадиях постнатального развития // Известия ТСХА. 2020. Вып. 1. С. 61–75.
- Понов С.В., Ильченко О.Г. Методические рекомендации по этологическим наблюдениям за млекопитающими в неволе. М.: Б. и., 1990. 40 с.
- Расс Т.С. Ступени онтогенеза костистых рыб (*Teleostei*) // Зоол. журн. 1946. Т. 25. С. 13–148.
- Akster H.A. Morphometry of muscle fibre types in the carp (*Cyprinus carpio* L.). Relation between structural and contractile characteristics // Cell and Tissue Res. 1985. V. 241. P. 193–201.
- Alami-Durante H., Fauconneau B., Rouel M., Escaffre A.M., Bergot P. Growth and multiplication of white skeletal muscle fibres in carp larvae in relation to somatic growth rate // J. Fish Biol. 1997. V. 50. P. 1285–1302.
- Ayala M.D., Lopez-Albors O., Gil F., Ramfrez-Zarzosa G, Abelin E., Moreno F. Red muscle development of gilt-head sea bream *Sparus aurata* (L.): structural and ultrastructural morphometry // Anat. Histol. Embryol. 1999. V. 28. P. 17–21.
- Balart E.E. Development of median and paired fin skeleton of *Paralichthys olivaceus* (Pleuronectiformes: Para-



- lichthyidae) // Japan. J. Ichthyol. 1985. V. 31. P. 398–410.
- Boddeke R., Slijpear B.J., van der Stelt Histological characteristics of the body musculature of fishes in connection with their mode of life // Koninklijkened. Acad. Wetenschappen. 1959. Ser. C. V. 62. P. 576–588.
- Bone Q. On the function of the two types of myotomal muscle fibre in elasmobranch fish // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 1966. V. 46. P. 321–349.
- Brooks S., Vieira V.L.A., Johnston I.A., Macheru P. Muscle development in larvae of a fast-growing tropical freshwater fish, the curimati-pacu // J. Fish Biol. 1995. V. 47. P. 1026–1037.
- Carvalho P.S.M., Noltie D.B., Tillitt D.E. Biochemical, histological and behavioral aspects of visual function during early development of rain bowtrout // J. Fish. Biol. 2004. V. 64. P. 833–850.
- Carpene E., Veggetti A. Increase in muscle fibres in the lateral is muscle (white portion of Mugilidae) (Pisces, Teleostei) // Experientia. 1981. V. 37. P. 191–193.
- Cooper J.E. Eggs and larvae of the logperch, *Percinacaprodes* (Rafinesque) // Am. Midl. Nat. 1978a. V. 99. P. 257–269.
- Cooper J.E. Identification of eggs, larvae, and juveniles of the rainbow smelt, *Osmerus mordax*, with comparison to larval alewife, *Alosa pseudoharengus*, and gizzard shad, *Dorosomacepedianum* // Trans. Am. Fish. Soc. 1978b. V. 107. P. 56–62.
- EI-Fiky N., Hinterleitner S., Wieser W. Differentiation of swimming muscles and gills, and development of anaerobic powerint helarvae of cyprinid fish (Pisces, Teleostei) // Zoomorphology. 1987. V. 107. P. 126–132.
- Van Raamdonk W., Pool C.M., Te Kronnie G. Differentiation of muscle fibre types in (*Brachydanio rerio*) // Anat. Embriol. 1978. V. 153. P. 137–155.
- Faustino F., Makino L.C., Neumann E., Nakaghi L.S.O. Histological description of the larval development of *Brycongouldingi* Lima, 2004 (Teleostei, Characidae) // International J. Aquatic Biology. 2018. V. 6. P. 75–87. <https://doi.org/10.22034/ijab.v6i2.361>
- Fuiman L.A. Descriptions and comparisons of catostomid fish larvae: northern Atlantic drainage species // Trans. Am. Fish. Soc. 1979. V. 108. P. 560–603.
- Fuiman L.A. Growth gradients in fish larvae // J. Fish Biol. 1983. V. 23. P. 117–123.
- Galloway T.F., Kjersvik E., Kryvi H. Muscle growth and development in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua* L.) related to different somatic growth rates // J. Exp. Biol. 1999a. V. 202. P. 2111–2120.
- Galloway T.F., Kjersvik E., Kryvi H. Muscle growth in yolk-sac larvae of the Atlantic halibut as influenced by temperature in the egg and yolk-sac stage // J. Fish Biol. 1999b. V. 55 (Suppl. A). P. 26–43.
- Gibson S., Johnston I.A. Temperature and development in larvae of the turbot *Scophthalmus maximus* // Mar. Biol. 1995. V. 124. P. 17–25.
- Higgins P.J. The histochemistry of muscle in juvenile atlantic salmon, *Salmo salar* L. // J. Fish Biol. 1990. V. 37. P. 521–529.
- Hirsinger E., Stellabotte F., Devoto S.H., Westerfield M. Hedgehog signaling is required for commitment but not initial induction of slow muscle precursors // Dev. Biol. 2004. V. 275. P. 142–157.
- Jing Hu, Yibing Liu, Zhenhua Ma, Jian G. Manuel feeding and development of warm water marine fish larvae in early life // 2018. Chapter10. P. 275–296.
- Johnston I.A., Camm J.P. Muscle structure and differentiation in pelagic and demersal stages of the Antarctic teleost *Notothenianeglecta* // Mar. Biol., 1987. V. 94. P. 183–190.
- Johnston I.A. Development and plasticity of fish muscle with growth // Bas. Appl. Myol. 1994. V. 4. P. 353–368.
- Johnston I.A., Cole N.J., Abercromby M., Vieira V.L.A. Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring // J. Exp. Biol. 1998. V. 201. P. 623–646.
- Johnston I.A., Bower N.I., Macqueen D.J. Review. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish // J. Exp. Biol. 2011. V. 214. P. 1617–1628.
- Kiessling A., Storebakken T., Asgard T., Kiessling K.-H. Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age. I. Growth dynamics // Aquaculture. 1991. V. 93. P. 335–356.
- Kilarski W. Histochemical characterization of myotomal muscle in the roach, *Rutilus rutilus* (L.) // J. Fish Biol. 1990. V. 36. P. 353–362.
- Kohno H., Taki Y., Ogasawara Y., Shirojo Y., Taketomi M., Inoue M. Development of swimming and feeding functions in larval *Pagrus major* // Japan. J. Ichthyol. 1983. V. 30. P. 47–60.
- Mascarello F., Rowlerson A., Radaelli G., Scapolo P.A., Veggetti A. Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* (L.): I. Myosin expression and organization of fiber types in the lateral muscle from hatching to adult // J. Muscle Res. Cell. Mot. 1995. V. 16. P. 213–222.
- Marques C., Faustino F., Bertolucci B., Paes M.C.F., Silva R.C., Nakaghi L.S.O. Embryonic development in Zungaroja-hu // Zygote. 2017. V. 25. P. 1–15. <https://doi.org/10.1017/S0967199416000277>
- Nag A.C., Nursall J.R. Histogenesis of white and red muscle fibres of trunk muscles of a fish, *Salmo gairdneri* // Cytobios. 1972. V. 6. P. 227–246.
- Nathanailides C., Lopez-Albors O., Stickland N.C. Influence of pre-hatch temperature on the development of muscle cellularity in post-hatch *Atlanticsalmon* (*Salmo salar*) // Can. J. Fish Aquat. Sci. 1995. V. 52. P. 675–680.
- Omori M., Sugawara Y., Honda H. Morphogenesis in hatchery-reared larvae of the black rockfish, *Sebastes schlegeli*, and its relationship to the development of swimming and feeding functions // Ichthyol. Res. 1996. V. 43. P. 267–282.
- Osse J.W.M., van den Boogaart J.G.M., van Snik G.M.J., van der Sluys L. Priorities during early growth of fish larvae // Aquaculture. 1997. V. 155. P. 249–258.
- Panov V.P., Safonova S.S., Orlov A.M., Artemenkov D.V. Histostructure of the locomotor apparatus in the three deep-water species of lanternfishes (*Myctophidae*): *Myctophum punctatum*, *Notoscopelus kroyeri*, and *Lampanyctus macdonaldi* // J. Ichthyology. 2019. V. 59. P. 928–937).

- Potthoff T., Kelley S., Collis L.A. Osteological development of the red snapper, *Lutjanus campechanus* (Lutjanidae) // Bull. Mar. Sci. 1988. V. 43. P. 1–40.
- Proctor C., Mosse P.R.L., Hudson R.C.L. A histochemical and ultrastructural study of the development of the propulsive musculature of the brown trout, *Salmo trutta* L., in relation to its swimming behavior // J. Fish Biol. 1980. V. 16. P. 309–329.
- Ramirez-Zarzosa G., GiP F., Latorre R., Ortega A., Garcia-Alcarfiz A., Abellfin E., Vfizquez J.M., Lopez-Albors O., Arencibia A., Moreno E. The larval development of lateral musculature in gilthead seabream *Sparus aurata* and seabass *Dicentrarchus labrax* // Cell Tissue Res. 1995. V. 280. P. 217–224.
- Ramirez-Zarzos G., Gil F., Vazquez J.M., Arencibia A., Latorre R., Lopez-Albors O., Ortega A., Moreno F. The post-larval development of lateral musculature in gilt-head sea bream *Sparus aurata* (L.) and sea bass *Dicentrarchus labran* (L.) // Anat. Histol. Embryol. 1998. V. 27. P. 21–29.
- Rowlerson A., Scapolo P.A., Mascarello F., Carpena E., Veggetti A. Comparative study in myosins present in the lateral muscle in some fish; species variations in myosin isoforms and their distribution in red, pink and white muscle // J. Muscle Res. Cell. Mot. 1985. V. 6. P. 601–640.
- Rowlerson A., Mascarello F., Radaelli G., Veggetti A. Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* (L.): 11. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle from hatching to adult // J. Muscle Res. Cell. Mot. 1995. V. 16. P. 223–236.
- Sampaio K.H., Prado P.S., Sato Y., Bazzoli N., Rizzo E. Comparative morphology of the oocyte surface and early development in four Characiformes from the São Francisco River // J. Morph. 2015. V. 276. P. 1258–1272.  
<https://doi.org/10.1002/jmor.20416>
- Snyder D.E., Snyder M.B.M., Douglas S.C. Identification of goldenshiner, *Notemigonus crysoleucas*, spotfinshiner, *Notropis pilopterus*, and fathead minnow, *Pimephales promelas*, larvae // J. Fish. Res. Bd. Can. 1977. V. 34. P. 1397–1409.
- Stickland N.C., White R.N., Mescall P.E., Crook A.R., Thorpe J.E. The effect of temperature on myogenesis in embryonic development of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) // Anat. Embryol. 1988. V. 178. P. 253–257.
- Taki Y., Kohno H., Hara S. Morphological aspects of the development of swimming and feeding functions in the milkfish *Chanos chanos* // Jap. J. Ichthyol. 1987. V. 34. P. 198–208.
- Valente L.M.P., Rocha E., Gomes E.F.S., Silva M.W., Oliveira M.H., Monteiro R.A.F., Fauconneau B. Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast- and slowgrowing strains of rainbow trout // J. Fish Biol. 1999. V. 55. P. 675–691.
- Van Raamsdonk W., van't Veer L., Veeken K., Heyting C., Pool C.W. Differentiation of muscle fibre types in the teleost brachydaniorerio, the zebrafish posthatching development // Anat. Embryol. 1982. V. 164. P. 1–62.
- Veggetti A., Mascarello F., Scapolo P.A., Rowlerson A. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax* (L.). An ultrastructural and morphometric study // Anat. Embryol. 1990. V. 182 P. 1–10.
- Veggetti A., Rowlerson A., Radaelli G., Arrighi S., Domeneghini C. Posthatching development of the gut and lateral muscle in the sole, *Solea solea* (L.) // J. Fish Biol. 1999. V. 55 (Suppl. A). P. 44–65.
- Viera V.L.A., Johnston I.A. Influence of temperature on muscle-fibre development in larvae of the herring *Clupea harengus* // Mar. Biol. 1992. V. 112. P. 333–41.
- Watson W. Larval development of the endemic Hawaiian blennioid, *Enchelyurus brunneolus* (Pisces: Blenniidae: Omobranchini) // Bull. Mar. Sci. 1987. V. 41. P. 856–888.
- Weatherley A.H., Gil H.S. Growth dynamics of white myotomal muscle fibres in the bluntnose minnow, *Pimephales notutus* Ratinésque, and comparison with rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson // J. Fish Biol. 1984. V. 25. P. 13–24.
- Weatherley A.H., Gill H.S., Lobo A.F. Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibres in teleosts and their relationship to somatic growth and ultimate size // J. Fish Biol. 1988. V. 33. P. 851–859.

## Ethological Features in the Bony Fish Apparatus of Movement (on the Example of the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss walbaum*)

V. P. Panov<sup>1</sup> \*, S. S. Safonova<sup>1</sup> \*\*, and I. V. Baydarov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Timiryazevskaya str., 49, Moscow, 127559 Russia

\*e-mail: panovval@gmail.com

\*\*e-mail: Sfalij@yandex.ru

This article presents data on the features of structural adaptive changes in the somatic musculature of rainbow trout at various stages of early postnatal ontogenesis. The somatic muscular system development is directly related with the locomotor behavioral acts of fish. During pre-larval period, the underdeveloped muscles are prepared for lifting to the water surface. This is necessary for the initial swim bladder filling with air. The larval period is characterized by pronounced swimming movements accompanying active exogenous nutrition. Fry acquire locomotion features characteristic of juvenile individuals with well-developed musculature.

**Keywords:** rainbow trout, postnatal ontogenesis, ethological features, muscle tissue

УДК 591.481.4+595.7

## ГИГАНТСКИЕ КЛЕТКИ КОРТИКАЛЬНОЙ ГЛИИ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ НАСЕКОМЫХ

© 2022 г. А. А. Панов<sup>@</sup>

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

<sup>@E-mail:</sup> tortrix@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.12.2021 г.

После доработки 23.02.2022 г.

Принята к публикации 11.03.2022 г.

Клетки кортикальной глии расположены в слое тел нейронов мозга и ганглиев нервной цепочки. Существует, по крайней мере, два размерных класса кортикальной глии: мелкоклеточная и “гигантская”, имеющая большие, по-видимому, полиплоидные ядра. В результате обследования головного мозга у насекомых 152 видов из 13 отрядов насекомых с неполным и полным превращением установлено, что большинству исследованных насекомых свойственна мелкоклеточная кортикальная глия. Гигантская кортикальная глия состоит из предположительно полиплоидных клеток. Она характерна для чешуекрылых и ручейников, а также встречается у некоторых видов клопов, перепончатокрылых и жуков. Особый тип глии с политенными хромосомами в ядрах найден у исследованных двукрылых из надсемейства Muscoidea.

**Ключевые слова:** кортикальная глия, полиплоидия, политения, центральная нервная система, насекомые

**DOI:** 10.31857/S1026347022050171

Глия является системой клеточных элементов внутри нервной системы, которая обеспечивает структурную стабильность и функционирование нервных клеток. Как и у других животных, глиальная система насекомых включает клетки, различающиеся морфологией, топографией и функциональными задачами. В современной литературе принято подразделение глиальных клеток насекомых на четыре основных типа: перинейриум, субперинейральная глия, кортикальная глия и нейропилярная глия, подразделяющаяся на обкладочную и астроцитоподобную глию. Кроме того, выделяют класс глиальных клеток, сопровождающих нервные волокна в корешках нервов (Edwards, Meinertzhagen, 2010; Freeman, 2015). Иногда при классификации клеток глии учитываются и более второстепенные характеристики, и тогда число выделяемых типов глиальных клеток может возрастать в несколько раз, например до 14 в первом грудном ганглии табачного бражника *Manduca sexta* (Cantera, 1993).

Кортикальная глия, о которой пойдет речь в данной статье, представляет собой собрание глиальных клеток, приуроченное к слою тел нейронов мозга и туловищных ганглиев. Ей приписываются две основные функции: формирование опорного остова, в который заключены тела нейронов, и выполнение ряда метаболических функций

(Freeman, 2015). Это особенно очевидно в случае крупных тел мотонейронов, у которых формируется “трофоспонгий”, система впячиваний плазматической мембраны тел нейронов, в которые входят тонкие отростки клеток кортикальной глии (Wigglesworth, 1959).

Только для дрозофилы разработаны молекулярно-генетические методы селективного выявления клеток кортикальной глии (Awasaki *et al.*, 2008). Для других насекомых эти методы неприменимы, и при обычных гистологических методах окраски отчетливо выявляются только ядра клеток и какая-то часть околядерной цитоплазмы. Поэтому топографические и морфологические характеристики клеток кортикальной глии дают преимущественно на основе их ядер.

Известно существование, по крайней мере, двух размерных типов клеток кортикальной глии. Клетки с небольшими округлыми или овальными ядрами поперечником в несколько микронов были найдены, например, у *Periplaneta americana* (Scharrer, 1939) и *Drosophila melanogaster* (Hartenstein *et al.*, 2008). С другой стороны, у ряда насекомых были обнаружены “гигантские” клетки с большими полиморфными ядрами, которые, судя по их положению, могли быть отнесены к кортикальной глии. Среди насекомых с неполным превращением такие клетки были обнаружены у

клопа *Rhodnius prolixus* (Wigglesworth, 1959), а среди представителей Holometabola — у медоносной пчелы (Weyer, 1931; Risler, 1954), двух видов жуков (De Lerma, 1949), комнатной мухи (Grandori *et al.*, 1951) и нескольких видов чешуекрылых (Schrader, 1938; Панов, 1963; Nordlander, Edwards, 1969; Cantera, 1993). При этом для некоторых видов были указаны размеры ядер гигантских клеток: до 90 мкм у *Hydrous piceus* (De Lerma, 1949), 60 × 15 мкм у клопа-родниуса, но только 35 мкм у *Oncopeltus fasciatus* и до 30 мкм у комнатной мухи (Grandori *et al.*, 1951).

Тем не менее, данные работы не позволяют достаточно объективно оценить степень распространения данного явления в классе насекомых. Поэтому цель работы — поиск гигантских кортикальных клеток у возможного более широкого круга насекомых и выявление их особенностей у разных представителей класса. Учитывая данные предыдущих исследований, мы определили условную размерную границу между “мелкими” и “гигантскими” ядрами клеток кортикальной глии на уровне ~30 мкм. Обследование проводили в надглоточном и подглоточном ганглиях за исключением зрительных долей, в которых система глиальных клеток построена особым образом и рассматривается отдельно от таковой “центрального” мозга (Nordlander, Edwards, 1969; Tix *et al.*, 1997).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы серии срезов головного мозга 152 видов из 13 отрядов насекомых с неполным и полным превращением из коллекции препаратов автора (табл. 1). Насекомые были собраны в течение длительного срока экспедиционных и лабораторных работ автором и сотрудниками-энтомологами ИПЭЭ РАН. Надрезанные насекомые были зафиксированы в жидкости Буэна, вычленившиеся надглоточные ганглии залиты в парапласт, а серии срезов толщиной 7–10 мкм окрашены железным гематоксилином Гейденгайна (Ромейс, 1953), после которого хорошо видны ядра глиальных клеток. Именно по их положению и была проведена идентификация различных типов глиальных клеток.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У исследованных поденок, тараканов, прямокрылых, палочников, уховерток и цикад (табл. 1) в слое тел нейронов головного мозга кортикальная глия была представлена только мелкими угловатыми клетками с округлыми или эллипсоидными ядрами, содержащими хроматин в виде интенсивно окрашивавшихся зерен. Поперечник ядер был сопоставим с диаметром ядер соседних нейронов или был даже меньше него (рис. 1а,

табл. 2). При использованном способе окраски препаратов цитоплазму либо вообще не выявляли, либо она была видна в виде тонких темно-окрашенных тяжиков, отходящих от околоядерной области и идущих между телами нейронов. Таким образом, клетки кортикальной глии видов насекомых указанных групп были подобны таковым, описанным ранее у американского таракана (Scharger, 1939).

Поскольку у клопа *R. prolixus* было отмечено существование гигантской кортикальной глии, представители отряда Heteroptera были исследованы подробнее. Всего в нашем распоряжении были срезы надглоточного ганглия клопов 17 видов из 10 семейств (табл. 1). Из этого состава только у 3 видов семейства Reduviidae в слое тел нейронов мозга были найдены гигантские глиальные ядра. Во-первых, они были найдены у *R. prolixus*, что подтверждает их существование в центральной нервной системе (цнс) этого клопа (Wigglesworth, 1959). Однако в их мозге, по-видимому, меньше, чем в исследованном Уиггслуорсом туловищном синганглии. Так, они были обнаружены только в дорсальном протоцеребруме, где их ядро, заполненное зернистым хроматином, окружало в виде шапочки собрание клеток Кеньона грибовидного тела (рис. 1б). Во-вторых, характерные гигантские ядра, были также найдены в мозге *Triatoma infestans* и *Triatoma maculata*. Помимо ядер, отделявших клетки Кеньона от соседних нейронов, в клеточном слое мозга обоих видов *Triatoma* имелись и другие гигантские ядра. Распределение и структура хроматина внутри гигантских ядер у указанных видов оказалось различным. У родниуса хроматиновые зерна были более мелкими (рис. 1б), а у видов *Triatoma* хроматин был собран в глыбки, более мелкие у *T. maculata* (рис. 1в) и более крупные у *T. infestans* (рис. 1г).

У клопов 14 других исследованных видов, представлявших 8 семейств, гигантские ядра в кортикальном слое головного мозга обнаружены не были. Только у 3 видов (*Dicranocephalus agilis* из сем. Stenocephalidae и *Enoplops scapha* и *Coreus marginatus* — оба из сем. Coreidae) размер некоторых ядер клеток кортикальной глии был несколько увеличенным, но не превосходил условную границу, разделяющую “мелкие” и “гигантские” клетки кортикальной глии (рис. 1д).

В крайне таксономически разнообразном отряде сетчатокрылых был обследован только мозг имаго *Chrysopa perla*. В клеточной коре среди тел нейронов были обнаружены только угловатые ядра с зернистым хроматином, сопоставимые по величине с ядрами соседних нейронов (рис. 1е).

У жуков размеры ядер клеток кортикальной глии оказались очень разными. Так, было подтверждено существование у большого водолюба “гигантских” ядер кортикальной глии, впервые

Таблица 1. Список исследованных видов

Отряд	Семейство	Вид
Ephemeroptera	Heptageniidae	<i>Ecdyonurus submontanus</i> L.
	Palingeniidae	<i>Palingenia fuliginosa</i> G.
	Ephemerellidae	<i>Ephemerella ignita</i> P.
Blattodea	Blattidae	<i>Periplaneta americana</i> L.
	Blaberidae	<i>Nauphoeta cinerea</i> Oliv.
Orthoptera	Tettigoniidae	<i>Tettigonia viridissima</i> L. <i>Sepiana sepium</i> Jers.
	Gryllidae	<i>Acheta domesticus</i> L.
Phasmatodea	Phasmatidae	<i>Extatosoma tiaratum</i> Mac. <i>Medauroidea extradentata</i> Br.
	Heteropterygidae	<i>Sungaria inexpectata</i> Z.
	Lonchodidae	<i>Carausius morosus</i> S.
Dermaptera	Forficulidae	<i>Forficula auricularia</i> L. <i>Anechura japonica</i> De Borman
	Labiduridae	<i>Labidura riparia</i> Pall.
Homoptera	Cicadidae	<i>Cicada orni</i> L. <i>Lyristes plebejus</i> Scopoli <i>Melampsalta musiva</i> Germar
Heteroptera	Notonectidae	<i>Notonecta glauca</i> L.
	Nepidae	<i>Nepa cinerea</i> L.
	Naucoridae	<i>Ilyocoris cimicoides</i> L.
	Reduviidae	<i>Rhodnius prolixus</i> Stål. <i>Triatoma infestans</i> Klug. <i>Triatoma maculata</i> Erichson
	Coreidae	<i>Coreus marginatus</i> L. <i>Enoplops scapha</i> Fabr.
	Rhopalidae	<i>Corizus hyoszyami</i> L.
	Pentatomidae	<i>Dolycoris baccarum</i> L. <i>Palomena prasina</i> L. <i>Perillus bioculatus</i> Fabr.
	Scutelleridae	<i>Eurygaster integriceps</i> Put.
	Pyrrhocoridae	<i>Dysdercus koenigii</i> Fabr. <i>Dysdercus volkeri</i> Schmidt <i>Pyrrhocoris apterus</i> L.
	Stenocephalidae	<i>Dicranocephalus agilis</i> Scop.
Neuroptera	Chrysopidae	<i>Chrysopa perla</i> L.
Coleoptera	Carabidae	<i>Carabus nemoralis</i> Müll.
	Hydrophilidae	<i>Hydrophilus piceus</i> L. <i>Hydrobius fuscipes</i> L. <i>Sphaeridium scarabaeoides</i> L.
	Silphidae	<i>Nicrophorus vespilloides</i> Hbst.
	Tenebrionidae	<i>Tenebrio molitor</i> L.
	Cerambycidae	<i>Morimus funereus</i> Mulsant

Таблица 1. Продолжение

Отряд	Семейство	Вид
Coleoptera	Geotrupidae	<i>Geotrupes stercorarius</i> L. <i>Geotrupes puncticollis</i> Malinovsky
	Passalidae	<u>sp. indet.</u>
	Trogidae	<i>Trox eximius</i> Fald.
	Lucanidae	<i>Lucanus cervus</i> L. <i>Lucanus ibericus</i> Motsch. <i>Prismognathus angularis</i> C.O. Waterhouse
	Glaphyridae	<i>Amphicoma vulpes</i> Fabr.
	Scarabaeidae-Aphodiinae	<i>Aphodius fossor</i> L. <i>Aphodius rufipes</i> L. <i>Aphodius rectus</i> Motsch.
	Scarabaeidae-Scarabaeinae	<i>Gymnopleurus mopsus</i> Pall. <i>Copris lunaris</i> L. <i>Caccobius schreberi</i> L. <i>Oniticellus fulvus</i> Gz. <i>Onthophagus speculifer</i> Solsky <i>Scarabaeus carinatus</i> Gebler
	Scarabaeidae-Melolonthinae	<i>Serica brunnea</i> L. <i>Miltotrogus aequinoctialis</i> Hbst. <i>Amphimallon volgensis</i> Fischer <i>Hoplia parvula</i> Krynicki <i>Melolontha hippocastani</i> Fabr. <i>Polyphylla fullo</i> L. <i>Anoxia pilosa</i> Fabr.
	Scarabaeidae-Rutelinae	<i>Phyllopertha horticola</i> L. <i>Adoretus nigrifrons</i> Stev. <i>Anisoplia agricola</i> Poda.
	Scarabaeidae-Dynastinae	<i>Oryctes nasicornis</i> L. <i>Pentodon algerinum bispinifrons</i> Reitter
Scarabaeidae-Cetoniinae	<i>Trichius fasciatus</i> L. <i>Cetonia aurata</i> L. <i>Protaetia metallica</i> Herbst <i>Oxythyrea funesta</i> Poda. <i>Tropinota hirta</i> Poda.	
Hymenoptera	Diprionidae	<i>Neodiprion sertifer</i> Geoffr.
	Crabronidae	<i>Bembix</i> sp.
	Sphecidae	<i>Ammophila</i> sp.
	Chrysididae	<i>Chrysis ignita</i> L.
	Vespidae	<i>Vespa crabro</i> L.
	Apidae	<i>Apis mellifera</i> L. <i>Xylocopa</i> sp.
	Formicidae	<i>Formica rufa</i> L.
Trichoptera	Limnephilidae	<i>Limnephilus rhombicus</i> L. <i>Limnephilus flavicornis</i> Fabr. <i>Glyphotaelius pellucidus</i> Retz.
	Phryganeidae	<i>Phryganea grandis</i> L.

Таблица 1. Продолжение

Отряд	Семейство	Вид
Lepidoptera	Yponomeutidae	<i>Yponomeuta padella</i> L.
	Nymphalidae	<i>Aglia io</i> L. <i>Apatura ilia</i> Den. et Schiff.
	Lasiocampidae	<i>Malacosoma neustria</i> L.
	Bobycidae	<i>Bombyx mori</i> L.
	Saturniidae	<i>Saturnia pavonia</i> L. <i>Antheraea pernyi</i> Guér. <i>Hyalophora cecropia</i> L.
	Sphingidae	<i>Laothoe populi</i> L.
	Notodontidae	<i>Cerura vinula</i> L.
	Noctuidae	<i>Agrotis segetum</i> Den. et Schiff. <i>Agrotis exclamationis</i> L.
	Erebidae	<i>Spilosoma lubricipedia</i> L. <i>Hyphantria cunea</i> Drury <i>Lymantria dispar</i> L.
Diptera	Tipulidae	<i>Tipula peliostigma</i> Schummel <i>Tipula truncorum</i> Meig. <i>Nephrotoma tenuipes</i> Riedel
	Pediciidae	<i>Pedicia rivosa</i> L.
	Limoniidae	<i>Limonia quadrimaculata</i> L. <i>Epiphragma ocellare</i> L.
	Ptychopteridae	<i>Ptychoptera contaminate</i> L.
	Anisopodidae	<i>Sylvicola fenestralis</i> Scopoli <i>Sylvicola punctatus</i> Fabr.
	Bibionidae	<i>Bibio marci</i> L.
	Bombyliidae	<i>Hemipenthes maura</i> L.
	Asilidae	<i>Dasypogon diadema</i> Fabr. <i>Stenopogon sabaudus</i> Fabr.
	Therevidae	<i>Thereva nobilitata</i> Fabr.
	Rhagionidae	<i>Rhagio tringarius</i> L.
	Stratiomyidae	<i>Sargus cuprarius</i> L.
	Xylomyidae	<i>Xylomyia czekanovskii</i> Pleske
	Tabanidae	<i>Haematopota pluvialis</i> L.
	Xylophagidae	<i>Coenomyia ferruginea</i> Scop.
	Dolichopodidae	<i>Dolichopus brevipennis</i> Meig.
	Empididae	<i>Empis tessellata</i> Fabr. <i>Empis stercorea</i> L.
	Syrphidae	<i>Epistrophe nitidicollis</i> Meig. <i>Eristalis</i> sp.
	Conopidae	<i>Sicus abdominalis</i> Kröber
	Lauxaniidae	<i>Minettia longipennis</i> Fabr.
	Dryomyzidae	<i>Dryomyza anilis</i> Fall.

Таблица 1. Окончание

Отряд	Семейство	Вид
Diptera	Sciomyzidae	<i>Sepedon sphaegee</i> Fabr. <i>Ilione rossica</i> Mayer
	Sepsidae	<i>Nemopoda nitidula</i> Fall.
	Psilidae	<i>Psila fimetaria</i> L.
	Glossinidae	<i>Glossina morsitans</i> Westw. <i>Glossina pallidipes</i> Austen
	Fanniidae	<i>Fannia scalaris</i> Fabr.
	Muscidae	<i>Hydrotaea ignava</i> Harris <i>Potamia littoralis</i> R.-D. <i>Muscina prolapsa</i> Harris <i>Muscina stabulans</i> Fall. <i>Muscina levida</i> Harris <i>Musca domestica</i> L.
	Scatophagidae	<i>Scatophaga stercoraria</i> L.
	Calliphoridae	<i>Calliphora vomitoria</i> L. <i>Calliphora vicina</i> R.-D. <i>Calliphora uralensis</i> Vill. <i>Lucilia sericata</i> Meig. <i>Phormia regina</i> Meig.
	Sarcophagidae	<i>Sarcophaga</i> sp.
	Tachinidae	<i>Tachina fera</i> L.

Таблица 2. Максимальный размер сечений ядер кортикальной глии (виды насекомых с “гигантскими” ядрами кортикальной глии выделены жирным шрифтом)

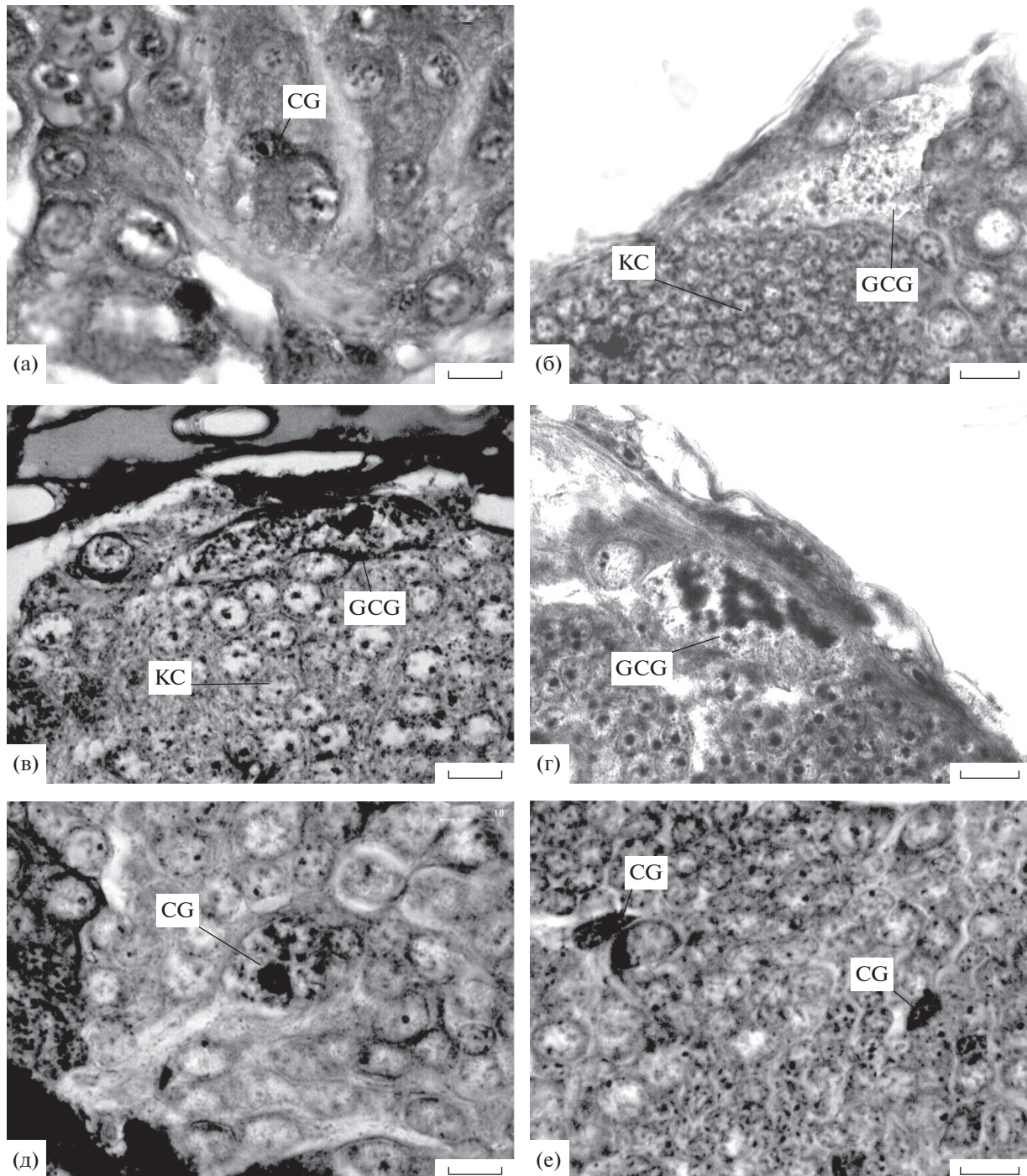
Вид насекомого	Размер в мкм, округлено до 1 мкм
<i>Acheta domesticus</i>	8
<b><i>Rhodnius prolixus</i></b>	53
<b><i>Triatoma infestans</i></b>	40
<b><i>T. maculata</i></b>	54
<i>Geotrupes stercorarius</i>	16
<i>Protaetia metallica</i>	15
<i>Trox eximius</i>	10
<i>Amphimallon volgensis</i>	12
<i>Anoxia pilosa</i>	18
<i>Phyllopertha horticola</i>	23
<b>Passalidae</b>	40
<b><i>Polyphylla fullo</i></b>	30
<b><i>Apis mellifera</i></b>	65
<b><i>Lymantria dispar</i></b>	72
<b><i>Limnephilus flavicornis</i></b>	49
<b><i>Muscina stabulans</i></b>	27
<b><i>Hydrotaea ignava</i></b>	28
<i>Lucilia sericata</i>	9
<i>Sarcophaga</i> sp.	16
<i>Limonia quadrimaculata</i>	14

описанных де Лермой (De Lerma, 1949). Однако у *Hydrobius fuscipes* и *Sphaeridium scarabaeoides* из того же семейства водолюбов, равно как и у *Nicrophorus vespilloides* из семейства Silphidae клетки кортикальной глии были мелкими. Также небольшими размерами характеризовались клетки кортикальной глии у изученных представителей жуужелиц, чернотелок и усачей.

Чтобы выяснить, имеется ли связь размера клеток кортикальной глии с таксономическим положением вида, были исследованы надглоточные ганглии жуков 34 видов из 5 семейств надсемейства Scarabaeoidea (табл. 1). В целом, за некоторыми исключениями, “низшие” скарабеоиды имеют клетки кортикальной глии малого размера (рис. 2а). Исключениями являются представители Passalidae (табл. 2) и Glaphyridae. У неопределенного представителя пассалид из южного Вьетнама среди тел нейронов клеточной коры встречались крупные ядра глиальных клеток, сечения которых достигали в длину ~40 мкм (рис. 2б). У *Amphicoma vulpes* сечения ядер кортикальных глиальных клеток существенно различались по величине: среди тел нейронов можно было увидеть как мелкие ядра, так и ядра с поперечником, равным приблизительно трем диаметрам соседних нейронов.

Среди представителей сем. Scarabaeidae исследованные виды п/сем. Aphodiinae и Scarabaeinae



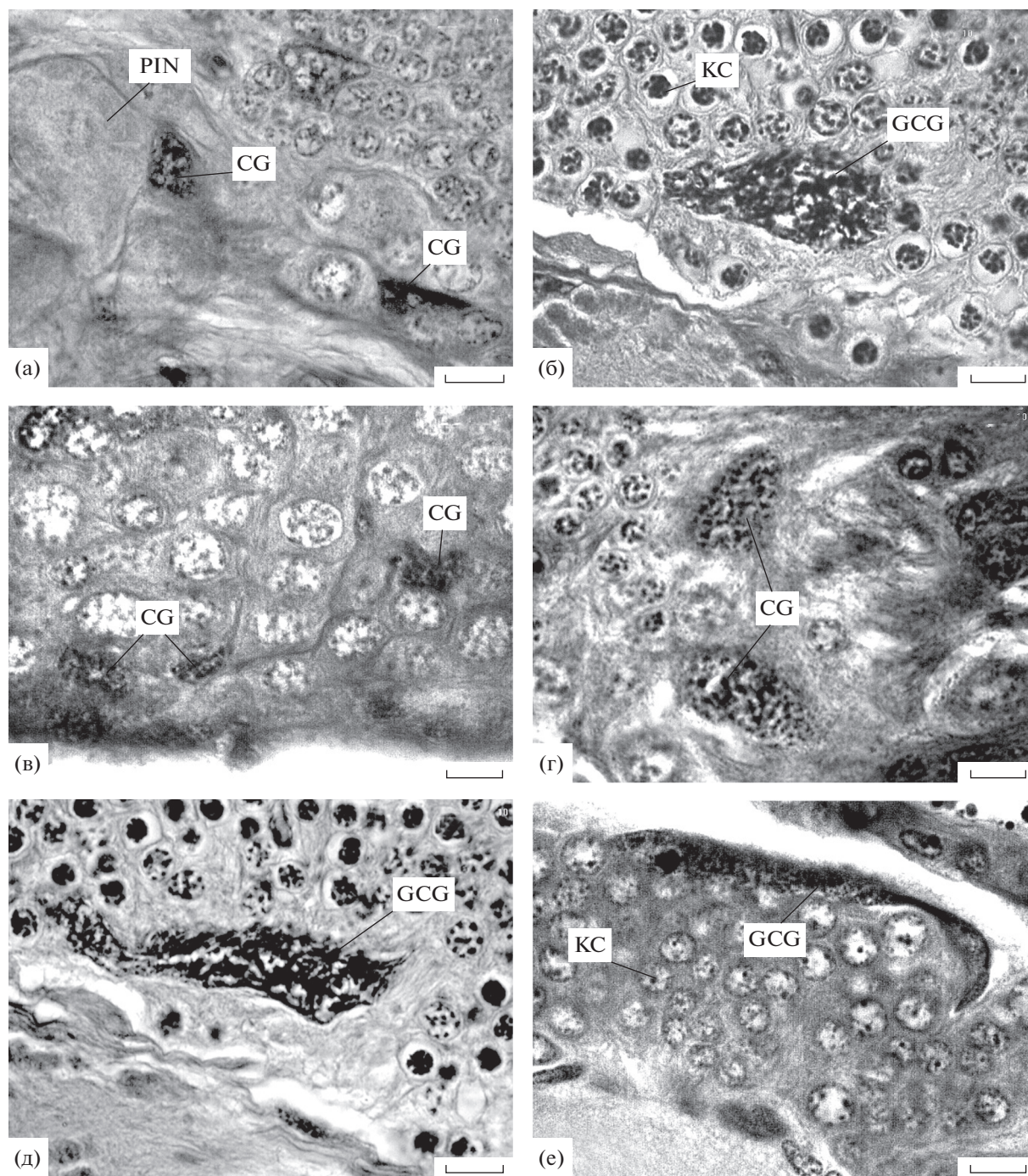


**Рис. 1.** Клетки кортикальной глии в головном мозге насекомых. (а) – *Acheta domesticus*, (б) – *Rhodnius prolixus*; (в) – *Triatoma maculata*; (г) – *Triatoma infestans*; (д) – *Coreus marginatus*; (е) – *Chrysopa perla*. CG – ядра кортикальной глии, GCG – “гигантские” ядра кортикальной глии, GCGс – цитоплазма “гигантских” клеток кортикальной глии, KC – клетки Кеньона грибовидных тел, TR – ядро трахеобласта: для рис. 1–3. Масштаб (рис. 1–3) – 10 мкм.

характеризуются мелкими клетками кортикальной глии. Также и у значительной части растительноядных скарабейд кортикальные клетки были мелкими (*Serica brunnea*, *Miltotrogus aequinoctialis*, *Amphimallon volgensis*, *Hoplia parvula*, *Adoretus nigrifrons*, *Pentodon algerinum bispinifrons*, *Trichius fasciatus*, *Oxythyrea fu-*

*nesta*, *Tropinota hirta*) (рис. 2в), а у меньшей части (*Melolontha hippocastani*, *Polyphylla fullo*, *Anoxia pilosa*, *Phylopertha horticola*, *Anisoplia agricola*, *Pentodon algerinum bispinifrons*, *Cetonia aurata*, *Protaetia metallica*) – средними по величине. Наиболее крупные ядра были найдены у *P. fullo* и *A. pilosa* (рис. 2г, табл. 2).





**Рис. 2.** Клетки кортикальной глии в головном мозге насекомых (продолжение). (а) – *Geotrupes stercorarius*; (б) – не определенный жук из сем. Passalidae; (в) – *Amphimallon volgensis*; (г) – *Polyphylla fullo*; (д) – *Apis mellifera*; (е) – *Lymantria dispar*.

Однако ни в одном случае не были обнаружены “настоящие” гигантские клетки, которые будут далее описаны у чешуекрылых.

Для исследованных перепончатокрылых, в основном, характерными оказались мелкие клетки кортикальной глии. Исключение представляет лишь медоносная пчела, у которой в клеточной

коре мозга некоторых экземпляров были обнаружены более крупные глиальные ядра (рис. 2д).

У единственного обследованного представителя скорпионниц, *Panorpa communis*, кортикальная глиа оказалась мелкоклеточной.

Чешуекрылые – отряд насекомых, у представителей которого, как уже отмечалось, наличие

гигантских полиморфных ядер в слое тел нейронов мозга и туловищных ганглиев было продемонстрировано наиболее убедительно. Чтобы проверить предположения о гигантизме клеток кортикальной глии как о черте, характерной по крайней мере для высших чешуекрылых в целом, в настоящей работе были исследованы срезы головного мозга чешуекрылых 15 видов из 9 семейств (табл. 1). У всех экземпляров были встречены типичные для чешуекрылых гигантские ядра клеток кортикальной глии. Как и у ранее исследованных видов, они частично располагались под слоем субперинейральной глии, а частично — в глубине клеточной коры. Хроматин имел зернистую структуру и равномерно заполнял ядро, либо был собран в его середине. Имелись крупные ядрышки, но их, по-видимому, в ядрах было немного, поскольку они встречались не во всех сечениях ядер (рис. 2е).

Ближайшими родственниками чешуекрылых являются ручейники, которые вместе с ними образуют надотряд *Amphiesmenoptera* (Kiriakoff, 1948). Поэтому в связи с широким распространением у чешуекрылых гигантизма клеток кортикальной глии было интересно узнать характеристики кортикальной глии и у ручейников. В нашем распоряжении было три вида ручейников (табл. 1). У всех них в слое тел нейронов были обнаружены гигантские ядра, которые как бы отграничивали клеточную кору от оболочки мозга или внедрялись между телами нейронов, ничем не отличаясь по форме и структуре от гигантских ядер кортикальной глии чешуекрылых (рис. 3а, табл. 2).

Для двукрылых в настоящее время известны два размерных типа клеток кортикальной глии: *Drosophila*-тип, характеризующийся малой величиной клеток и *Musca*-тип с крупными (“гигантскими”) глиальными клетками (Grandogri *et al.*, 1951). Мы также нашли в головном мозге комнатной мухи крупные округлые ядра с хроматиновыми глыбками, часто прилегающим к ядерной оболочке, и большим ядрышком. Эти ядра располагались в толще клеточной коры и около перинейриума. Вокруг них имелся слой волокнистой цитоплазмы, либо ядра были вплотную окружены телами соседних нейронов.

Помимо комнатной мухи, такие же ядра клеток кортикальной глии были нами найдены только у других представителей сем. *Muscidae* (табл. 1) (рис. 3б), а также у *Fannia scalaris* (*Fanniidae*) и *Scatophaga stercoraria* (*Scatophagidae*), т.е. у представителей семейств, входящих в надсемейство *Muscoidea*.

Наиболее подробно структура и расположение гигантских ядер кортикальной глии были изучены у трех видов *Muscina*. Как и у комнатной мухи, ядра встречались как на периферии слоя клеточной коры, так и внутри нее. У периферических ядер хорошо прослеживалась окружающая их цито-

плазма (рис. 3в). Ранее была отмечена пространственная связь гигантских ядер с вторичными нейробластами грибовидных тел (Панов, 2020).

У личинки 3-го возраста ядра кортикальной глии имели очень крупные ядрышки (рис. 3д), а средний поперечник ядер равнялся ~20 мкм. У предкуколок и куколок размер ядер увеличивался, а у имаго мог достигать почти 30 мкм. На всех стадиях развития ядра были округлыми и содержали одно ядрышко, размер которого был максимальным у личинок и уменьшался у куколок и имаго. На экваториальных сечениях ядер хроматин имел вид интенсивно окрашивавшихся, четко очерченных крупных глыбок, которые прилегали к оболочке ядра (рис. 3в). На тангенциальных срезах ядер, проходящих через их “горбушки”, было видно, что эти глыбки хроматина представляют собой фрагменты четковидных структур — политенных хромосом, (рис. 3г). У всех трех видов *Muscina* ни у личинок, ни в ходе метаморфоза не было найдено делений ядер клеток кортикальной глии.

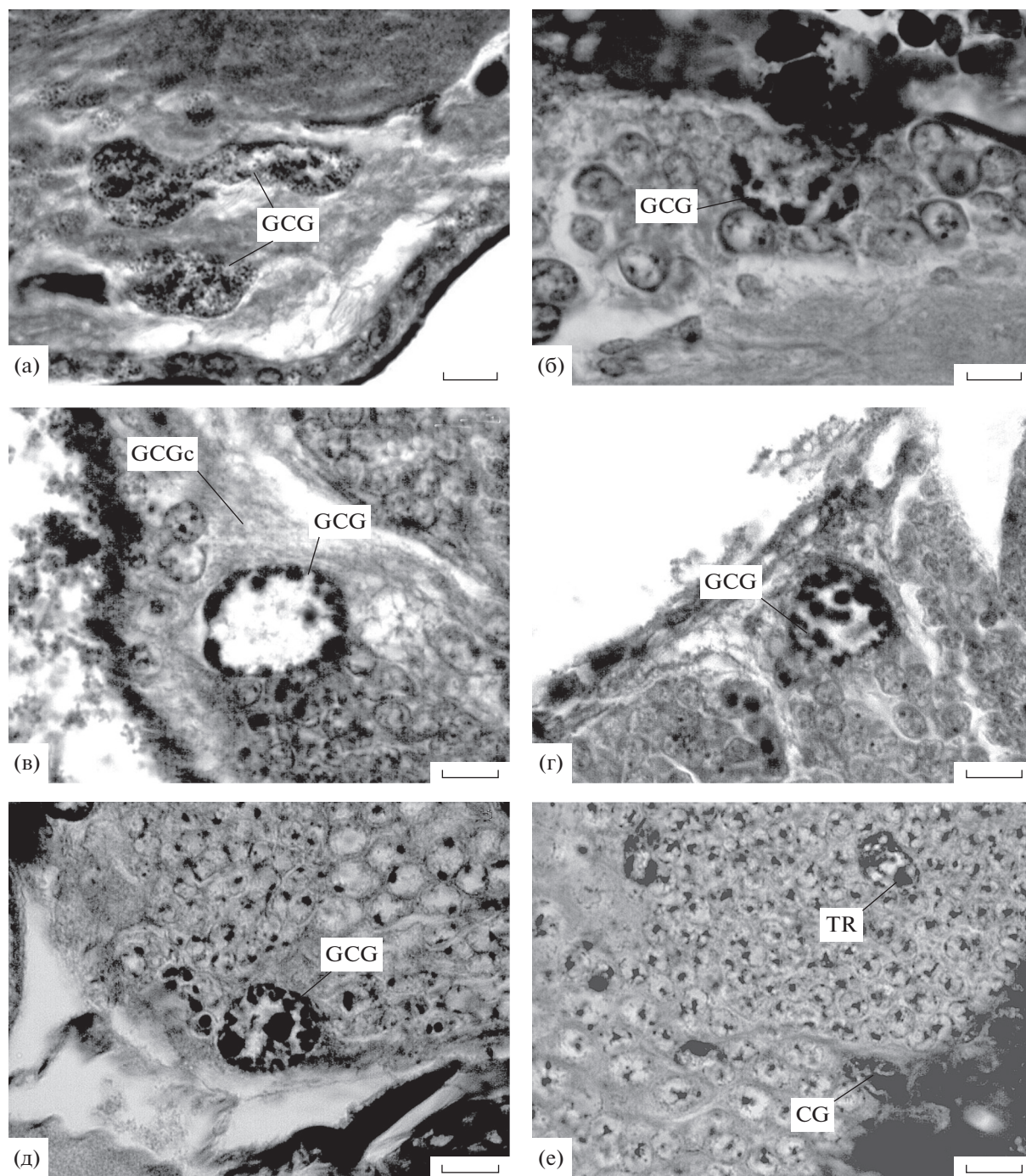
У всех остальных 40 видов, относящихся к 27 семействам длинноусых и короткоусых двукрылых (табл. 1), кортикальная глиа была мелко-клеточной (рис. 3е), а гигантские ядра кортикальной глии обнаружены не были.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование головного мозга 152 видов, представляющих 13 наиболее многочисленных по видовому составу отрядов класса насекомых, показало, что основным размерным типом кортикальной глии является мелкоклеточная глиа, морфологические, функциональные и молекулярно-генетические характеристики которой исследованы в последние годы у дрозофилы (Hartenstein, 2011). В туловищном синганглии дрозофилы в эмбриональное время клетки кортикальной глии, 6–8 на нейромер, образуются в результате делений четырех нейроглиобластов (Altenhain, 2015). Такое же число клеток кортикальной глии сохраняется у поздних эмбрионов и новорожденных личинок, но потом клетки начинают митотически делиться, и их число существенно возрастает. У домового сверчка *Acheta domestica*, также имеющего мелкоклеточную кортикальную глию, в нимфальное время ее клетки митотически делятся, как и клетки нейропилярной глии, в ритме линек. При этом пик митотической активности приходится на конец третьей — начало четвертой четверти межлиночного периода (Панов, 1962), когда у насекомых достигает пика титр линочного гормона.

Как показало настоящее исследование широкого круга насекомых, “гигантизм” кортикальной глии — явление, достаточно редко встречающееся





**Рис. 3.** Клетки кортикальной глии в головном мозге насекомых (продолжение). (а) – *Limnephilus flavicornis*; (б) – *Hydrotaea ignava*; (в) – *Muscina stabulans*; (г, д) – *Muscina levida*; (е) – *Limonia quadrimaculata*.

либо у отдельных видов, либо характерное для систематических групп различного ранга. При этом можно выделить два типа гигантизма. Первый тип, который характеризуется очень большими ядрами сложной формы, заполненными многочисленными мелкими зернами хроматина, наиболее полно представлен у чешуекрылых. Впервые такие

гигантские ядра были описаны у мельничной огневки (Schrader, 1938), однако автор посчитал их ядрами трахеоларных клеток. Позже у китайского дубового шелкопряда *Antheraea pernyi* в клеточном слое туловищных ганглиев и мозга были найдены гигантские ядра двух категорий, различавшихся по структуре. Одни из них, действительно,

были ядрами трахеоларных клеток, тогда как другие — ядрами гигантских кортикальных глиальных клеток (Панов, 1963).

У эмбрионов дубового шелкопряда в момент образования нейрилеммы непосредственно под ней, а также среди тел нейронов, были обнаружены немногочисленные эллипсоидные ядра, которые на более поздних этапах эмбриогенеза начинали отличаться от ядер нервных клеток неправильными очертаниями и равномерным распределением в ядре зерен хроматина. Ни у эмбрионов, ни у гусениц не встречались деления этих ядер. Вместе с тем, они интенсивно росли, становясь у взрослых гусениц самыми крупными клеточными ядрами как в мозге, так и в туловищных ганглиях.

Удалось установить лишь один период деления гигантских глиальных клеток, приходившийся на первые дни кукольного развития. В это время в поверхностном слое ганглиев в довольно большом числе встречались фигуры огромных митозов на стадии метафазы (Панов, 1963).

Существование гигантских клеток кортикальной глии у чешуекрылых было затем подтверждено при изучении постэмбрионального развития нервной системы у бабочки-монарха *Danaus plexippus plexippus*. У него также было найдено, что гигантские кортикальные глиальные клетки растут, не делясь, в течение личиночного периода развития, но вступают в митоз в начале метаморфоза (Nordlander, Edwards, 1969). При этом, как у китайского дубового шелкопряда, так и у бабочки-монарха были встречены гигантские митозы только в метафазе. Поэтому дальнейшая судьба вступивших в митоз гигантских кортикальных глиальных клеток осталась неизвестной.

В переднегрудном ганглии табачного бражника были также обнаружены гигантские клетки кортикальной глии, которые в период метаморфоза вступали в митоз, причем наблюдались даже мультиполярные митозы. Одновременное увеличение числа гигантских ядер, сопровождавшееся уменьшением их размеров, позволило предположить, что кариокинез завершается формированием дочерних ядер (Cantera, 1993).

Существует большая литература по проблеме связи размеров ядер со степенью их пloidности, которая содержит свидетельства как наличия такой связи, так и ее отсутствия (Бродский, Урываева, 1981). В современных обзорах говорится о существовании такой связи (Edgar, Orr-Weaver, 2001). Большие размеры ядер гигантской кортикальной глии и обилие хроматинового материала в них позволили предположить их полиплоидную природу (Johansson, 1957; Панов, 1963; Nordlander, Edwards, 1969). Это предположение было подтверждено Нордлендер и Эдвардсом, наблюдавшими в личиночное время многократные циклы включения  $H^3$ -тимидина в гигантские ядра кор-

тикальной глии бабочки-монарха без их последующих делений.

Случаи инструментально доказанной полиплоидности клеток глии цнс насекомых единичны. Так, относительно недавно было обнаружено, что клетки субперинеуральной глии *D. melanogaster*, входящей в состав гематоэнцефалического барьера, являются полиплоидными, и увеличение размера клеток субперинеуральной глии в результате полиплоидизации необходимо для поддержания в целостности межклеточных соединений, образующих гематоэнцефалический барьер. (Unhavaithaya, Orr-Weaver, 2012). В цнс имаго дрозофилы было обнаружено увеличение числа клеток с содержанием ДНК от 4С до более чем 16С по мере старения насекомого. При идентификации типа клеток в препаратах диссоциированной центральной нервной системы с помощью молекулярных маркеров было обнаружено, что за 2 нед. имагинальной жизни 6–7% глиальных клеток в целом начинают содержать более 2С ДНК (Nandakumar *et al.*, 2020).

Деления полиплоидных клеток были найдены в кишечнике личинок двукрылых. Фокс с сотр. (Fox *et al.*, 2010) обнаружили митотические деления октоплоидных клеток в задней кишке метаморфизирующей личинки дрозофилы, и на этом основании они сделали вывод, что вступление клеток в эндоцикл не является необратимым и не исключает возможности их последующего разведения с помощью митоза. По-видимому, это справедливо и для предположительно высокополиплоидных клеток кортикальной глии чешуекрылых, описанных в данной работе.

Вторым, особым видом полиплоидии является политения. В этом случае возникающие в ходе повторяющихся эндоциклов хромомемы не расходятся, а остаются тесно связанными, в результате чего формируются гигантские политенные хромосомы (Stormo, Fox, 2017). Политенными являются клетки ряда внутренних органов некоторых видов двукрылых и других насекомых (Бродский, Урываева, 1981).

На гистологических срезах политенные хромосомы обычно выглядят как крупные интенсивно окрашенные глыбки хроматина, плотно прилегающие к ядерной оболочке. Только на поверхностных сечениях ядер бывает видно, что эти глыбки объединены в четковидные цепочки — политенные хромосомы. До сих пор имелось только одно свидетельство присутствия политенных клеток в нервной системе насекомых. У *Drosophila virilis* политенные ядра были найдены в давленных препаратах туловищного синганглия личинки, однако их принадлежность к какому-либо определенному типу клеток установлена не была (Makino, 1938). Фактически политенные хромосомы у глиальных клеток комнатной мухи было впервые описаны Грандори с соавт. (Grandori *et al.*, 1951), однако

как таковые они квалифицированы не были. В высшей степени вероятное их присутствие в ядрах клеток кортикальной глии у нескольких видов мускоидных двукрылых – третий случай обнаружения политенных клеток в центральной нервной системе насекомых.

У насекомых большинство органов, содержащих клетки с политенными хромосомами, являются “личиночными”, дегенерирующими в ходе метаморфоза. Исключение составляют только мальпигиевы сосуды и трофоциты яичников (Бродский, Урываева, 1981). К таким переживающим метаморфоз структурам с политенными хромосомами относятся, очевидно, и клетки кортикальной глии, описанные у мускоидных двукрылых в настоящей работе. При этом ни в одном случае у них не было отмечено митозов в ходе постэмбрионального развития. Невозможность или большая редкость вхождения клеток с политенными хромосомами в митотический цикл объясняется особенностями структуры политенных хромосом и ошибками при редупликации генома в клетках этого типа (Edgar, Orr-Weaver, 2001)

Проведенная работа лишь обрисовывает общую картину распространения в кортикальной глии насекомых гигантизма клеток и, вероятнее всего, лежащей в ее основе их полиплоидности. Остается неизвестным, почему в отдельных группах насекомых разного таксономического ранга (от подсемейственного и до надотрядного) происходит переход от пролиферации исходных клеточных элементов к значительному росту клеток кортикальной глии без их умножения. Обычно считается, что при полиплоидизации, ведущей к росту клеток и увеличению их синтетических потенций, происходит экономия времени и средств по сравнению с ростом за счет пролиферации (Бродский, Урываева, 1981). По сравнению с митотическими циклами, сопровождающимися разрушением ядерной оболочки, формированием веретена, цитокинезом, восстановлением ядерной оболочки и проч., при эндорепликации сохраняются структура и специфическое функционирование полиплоидизирующихся клеток. Так, необходимостью непрерывного специфического функционирования объясняется, например, полиплоидизация удрозифилы клеток субперинейральной глии, формирующей гематоэнцефалический барьер (Unhavaithava, Orr-Weaver, 2012).

Что же касается кортикальной глии, то функциональные и морфогенетические причины случаев ее гигантизма и предполагаемой полиплоидной природы остаются неизвестными. Интересно отметить, что нейропилярная глия всегда бывает мелкоклеточной. Остается неясным, связан ли гигантизм кортикальной глии с общей тенденцией морфогенетических процессов в нервной системе насекомых той или иной группы. О возможности

существования такой связи говорят лишь единичные находки. Например, при исследовании состава мозговых нейросекреторных клеток были выделены 2 группы насекомых. У насекомых первой группы число нейросекреторных клеток росло в течение постэмбрионального развития за счет деятельности нейробластов. У насекомых второй группы медиальные нейросекреторные клетки головного мозга были относительно малочисленны, и их число, в основном, стабилизировалось уже к началу постэмбриогенеза. Интересно отметить, что у исследованных насекомых первой группы нейросекреторные клетки оставались диплоидными, а у имаго одного из насекомых второй группы они оказались тетраплоидными (Панов, Маршак, 1968). Именно насекомые с гигантскими клетками кортикальной глии входят в состав насекомых со стабильным составом медиальных нейросекреторных клеток головного мозга.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бродский В.Я., Урываева И.В. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка. М.: Наука, 1981. 259 с.
- Панов А.А. Характер размножения клеток в центральной нервной системе нимфы домового сверчка (*Gryllus domesticus* L., Orthoptera) // ДАН СССР. 1962. Т. 143. № 2. С. 471–474.
- Панов А.А. Происхождение и судьба нейробластов, нейронов и клеток нейроглии в центральной нервной системе китайского дубового шелкопряда *Antheraea pernyi* Guér. (Lepidoptera, Attacidae) // Энтомол. Обзор. 1963. Т. 42. Вып. 2. С. 337–350
- Панов А.А., Маршак Т.Л. Онтогенез медиальных нейросекреторных клеток насекомых и количество ДНК в их ядрах // ДАН СССР. 1968. Т. 183. № 5. С. 1193–1196.
- Панов А.А. Десятки на смену четырем: два поколения нейральных прогениторов в развивающихся грибовидных телах *Muscina prolapsa* Harris (Diptera, Muscidae) // Зоол. журн. 2020 Т. 99. № 8. С. 911–918.
- Ромейс Б. Микроскопическая техника. М.: Изд-во иностр. лит., 1953. 718 с. (Romeis B. Mikroskopische Technik. München: Leibnitz-Verlag [R. Oldenbourg-Verlag]. 1948. 695 s.)
- Altenhein B. Glial cell progenitors in the *Drosophila* embryo // *Glia*. 2015. V. 63. P. 1291–1302.
- Awasaki T., Lai S.-L., Ito K., Lee T. Organization and postembryonic development of glial cells in the adult central brain of *Drosophila* // *J. Neurosci*. 2008. V. 28. Issue 51. P. 13742–13753.
- Cantera R. Glial cells in adult and developing prothoracic ganglion of the hawk moth *Manduca sexta* // *Cell Tiss. Res.* 1993. V. 272. P. 93–108.
- De Lerma B. Sulla presenza di cellule giganti nel cerebrone e nella massa gangliare sottoesofagea dei Coleotteri // *Italian J. Zool.* 1949. V. 16. Issue 4–6. P. 169–177.

- Edgar B.A., Orr-Weaver T.L. Endoreplication cell cycles: more for less // *Cell*. 2001. V. 195. 297–306.
- Edwards T.N., Meinertzhagen I.A. The functional organisation of glia in the adult brain of *Drosophila* and other insects // *Prog. Neurobiol.* 2010. V. 90. Issue 4. P. 471–497.
- Fox D.T., Gall J.G., Spradling A.C. Error-prone polyploid mitosis during normal *Drosophila* development // *Gen. Dev.* 2010. V. 24. P. 2294–2302.
- Freeman M.C. *Drosophila* central nervous system glia // *Cold Spring Harbor Perspect Biol.* 2015. V. 7: a020552
- Grandori R., Grandori L., Caré E. Sulla presenza di cellule giganti nel sistema nervoso centrale di *Musca domestica* L. // *Boll. Zool. Agr. Bach.* 1951. V. 17. P. 93–99.
- Hartenstein V. Structure and development of glia in *Drosophila* // *Glia*. 2011. V. 59. Issue 9. P. 1237–1252
- Hartenstein V., Spindler S., Perea W., Fung S. The development of the *Drosophila* larval brain / Brain development in *Drosophila melanogaster* (G.M. Technau, ed.). Chapt.1. N.Y.: Springer Science, 2008. P. 1–31.
- Johansson A.S. The nervous system of the milkweed bug, *Onopeltus fasciatus* (Dallas) (Heteroptera, Lygaeidae) // *Transact. Amer. Entomol. Soc.* 1957. V. 83. № 3. P. 119–183.
- Kiriakoff S.G. A classification of the Lepidoptera and related groups with some remarks on taxonomy // *Biologisch Jaarboek*. 1948. V. 15. P. 118–143.
- Makino S. A morphological study of the nucleus in various kinds of somatic cells of *Drosophila virilis* // *Cytologia*. 1938 V. 9. P. 272–282.
- Nandakumar S., Grushko O., Buttitta L.A. Polyploidy in the adult *Drosophila* brain // *eLife*. 2020.V. 9. e 54385
- Nordlander R., Edwards J.S. Postembryonic brain development in the monarch butterfly, *Danaus plexippus plexippus* L. I. Cellular events during brain morphogenesis // *Wilhelm Roux' Arch. Entwickl. Mech. Org.* 1969. Bd. 162. H. 3. S. 197–217.
- Risler H. Die somatische Polyploidie in der Entwicklung der Honigbiene (*Apis mellifica*) // *Z. Zellforsch.* 1954. V. 41. H. 1. S. 1–78.
- Scharrer B. Differentiation between the neuroglia and connective tissue sheath in the cockroach *Periplaneta americana* // *J. Comp. Neurol.* 1939. V. 70. Iss. 1. P. 77–88.
- Schrader K. Untersuchungen über die Normalentwicklung des Gehirns und Gehirntransplantationen bei der Mehlmotte *Ephesia kühniella* Zeller nebst einigen Bemerkungen über das Corpus allatum // *Biol. Zbl.* 1938. Bd. 58. S. 52–90.
- Storno B.M., Fox D.T. Polyteny: still a giant player in chromosome research // *Chromosome Res.* 2017. V. 25. Issue 3–4. P. 201–214.
- Tix S., Eule E., Fischbach K.F., Benzer S. Glia in the chiasm and medulla of the *Drosophila melanogaster* optic lobes // *Cell Tissue Research*. 1997. V. 289. Issue 3. P. 397–409.
- Unhavaithaya Y., Orr-Weaver T.L. Polyploidization of glia in neural development links tissue growth to blood-brain barrier integrity // *Gen. Dev.* 2012. V. 26. P. 31–36.
- Weyer F. Cytologische Untersuchungen am Gehirn alternder Bienen und die Frage nach der Alterstod // *Z. Zellforsch.* 1931. Bd. 14. S. 1–54.
- Wigglesworth V.B. The histology of the nervous system of an insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). II. The Central Ganglia // *Quart. J. Micr. Sci.* 1959. V. 100. Issue 2. P. 299–313.

## Giant Cortex Glia Cells in the Insect Central Nervous System

A. A. Panov<sup>#</sup>

*Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Leninskii pr., 33, Moscow, 119071 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: tortrix@yandex.ru*

Cortical glia cells are located in the neuron body layer of the brain and the ganglia of the ventral nerve cord. There are at least two size classes of cortical glia: small-cell and “giant-cell,” which have large, apparently polyploid nuclei. As a result of examination of brains in 152 species from 13 orders of hemi- and holometabolous insects, it was found that small-cell cortical glia are characteristic of the majority of insects. The giant cortical glia is composed of presumably polyploid cells. It is characteristic of Lepidoptera and Trichoptera, and is also found in some species of Heteroptera, Hymenoptera, and Coleoptera. A special type of glia with polythemia chromosomes was found in the dipterans of Muscoidea superfamily.

**Keywords:** cortical glia, polyploidy, polythemia, central nervous system, insects



---

---

**ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ  
И ЧЕЛОВЕКА**

---

---

УДК 59.088

**ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ  
ЦЕЛЛЮЛАЗ В ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОМ ТРАКТЕ МЕЛКИХ  
ТРАВояДНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

© 2022 г. А. А. Варшавский\*, @, Е. И. Наумова\*

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

@E-mail: ulvhare@sev-in.ru

Поступила в редакцию 27.12.2021 г.

После доработки 17.02.2022 г.

Принята к публикации 18.03.2022 г.

Флуориметрический метод определения целлюлогидролазной активности (ЦА), используемый в работе с чистыми культурами, модифицирован для исследования содержимого пищеварительного тракта мелких млекопитающих, обитающих в естественных условиях. Проанализировано влияние разных способов консервации на активность ЦА в пробах химуса, взятых в полевых условиях. Оптимальным консервантом был признан 86%-ный глицерин. Построена математическая модель зависимости результатов измерения ЦА от концентрации химуса в пробе. Модель подтвердила влияние концентрации химуса на результаты измерения в диапазоне 5–15 г/л. Выяснено, что оптимальная концентрация химуса равна 10 г/л, т.е., для пробы требуется навеска 0.2 г химуса, консервированного в 1 мл 86%-ного глицерина, что легко выполнимо в полевых условиях.

*Ключевые слова:* мелкие травоядные млекопитающие, пищеварение, целлюлазы, флуориметрия

**DOI:** 10.31857/S1026347022050201

Разработка доступных методов оценки активности целлюлолитических симбионтов травоядных млекопитающих очень важна для понимания роли структурных углеводов в их питании. В физиологических исследованиях для этой цели обычно используют показатели переваримости сырой клетчатки, кислого (ADF) и нейтрального (NDF) детергентов волокон, полученные на экспериментальных млекопитающих (Goering, Van Soest, 1970; Sakaguchi *et al.*, 1987, 1992). Эти данные могут зависеть от многих факторов и отражают толерантность подопытных животных к предлагаемому рациону.

На биохимическом уровне используется ряд методов определения активности ферментов целлюлазного комплекса — вискозиметрические, фотометрические, флуориметрические и др. (Синицын и др., 1990; Sharma *et al.*, 2016). Эти методы предполагают исследование чистых ферментов, как правило, из чистых же культур выделенных микроорганизмов. Гораздо реже используют метод оценки переваримости целлюлозы *in vivo* (Лактионов, 2012), выполняемый на фистулированных животных. Исследование активности целлюлаз у сельскохозяйственных животных базируется на фотометрических методах (Давлетова и др., 1986). Перечисленные подходы по разным причинам неприемлемы для исследования естественного

фона активности целлюлаз у обитающих в природе животных. Кроме того, опубликованные результаты часто несопоставимы в силу использования разных единиц измерений.

С биохимической точки зрения целлюлазные системы в широком понимании определяются как системы, включающие ферменты, способные расщеплять 1,4-β-глюкозидные связи в полимерных формах целлюлозы, а также ферменты иной специфичности или некаталитические белки, способные действовать на поверхности целлюлозы, т.е., содержащие целлюлозосвязывающий домен (Рабинович, Мельник, 2000). Однако в рамках данной работы удобнее рассматривать целлюлазы как молекулярную машину, включающую два типа ферментов — экзоглюканазы, в первую очередь целлюбиогидролазы, разлагающие упорядоченные формы целлюлозы, и эндоглюканазы, гидролизующие глюкановые цепочки клетчатковых фибрилл (Tokuda *et al.*, 2005). Образующиеся в результате олигосахариды далее разлагаются до глюкозы при помощи β-глюкозидазы.

За основу для разработки методики, позволяющей оценить целлюлазную активность в пробах из диких животных, был принят флуориметрический метод с 4-метилумбеллиферил-β-D-целлюбиозидом (МУФ-Ц) в качестве субстрата (Синицын и др., 1990). Этот метод регистрирует целлюбиогид-

ролазную активность (ЦА), обладает высокой чувствительностью и работает при нейтральном рН (Coleman et al., 2007), характерном для локусов ферментации целлюлозы у млекопитающих.

Для разработки доступного в применении метода сбора материала и оценки целлюлазной активности у млекопитающих, живущих в естественных, а не экспериментальных условиях, прежде всего необходимо было решить следующие важные задачи по сбору, хранению и обработке материала: 1) выбрать оптимальный способ консервации и экстракции целлюлаз содержимого пищеварительного тракта (химуса). При отборе проб химуса в полевых условиях возникает задача их консервации для транспортировки в лабораторию и хранения до проведения измерений. Консервант должен не только сохранять пробы, но и экстрагировать ферменты целлюлазного комплекса; 2) разработать способ освобождения субстрата от гуминовых веществ и пищевых частиц, которыми богат желудочно-кишечный тракт; 3) найти оптимальную концентрацию химуса во флуориметрической пробе для получения воспроизводимых результатов. Скорость ферментативной реакции при избытке субстрата зависит от концентрации в реакционной смеси фермента, в данном случае содержащегося в химусе. Для выбора оптимальной концентрации было необходимо исследовать ее влияние на ЦА при экстракции буфером и 86%-ным глицерином; 4) составить протокол методики флуориметрического исследования ЦА в гетерогенном субстрате.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** Модельным объектом был выбран домашний кролик *Oryctolagus cuniculus*, типичный представитель специализированных растительноядных млекопитающих с кишечным типом ферментации. Объем основного локуса ферментации кролика – слепой кишки – достаточен для отбора нескольких повторностей проб химуса (все-го исследовано 44 образца). Это позволяет учесть неравномерность распределения целлюлазных комплексов по объему химуса и изучить активность при разных условиях отбора и хранения образцов. В работе использовались два взрослых кролика – лабораторный и фермерский, содержащиеся на разных кормах, обеспечивших априори разную целлюлазную активность, что важно для оценки работы метода в разных диапазонах ЦА. Лабораторного кролика в течение 3 суток перед опытом кормили сеном. Фермерский кролик все время содержался на смешанном корме (комбикорм, сено, пищевые отходы). Разные диапазоны активности образцов были необходимы для контроля чувствительности метода. Эвтаназия проводилась методом декапитации.

**Отбор проб.** Все пробы отбирали из слепой кишки в пластиковые пробирки типа “эппендорф” объемом 1.5 или 2 мл. Для экстракции целлюлаз в пробирки наливали 86%-ный глицерин или же фосфатный буфер рН 6.8–7.0 в количестве 1 или 1.5 мл в зависимости от объема пробирки. Пустые (для заморозки) или залитые экстрагентом пробирки взвешивали перед отбором проб с точностью 0.005 г. Химус отбирали шпателем или обрезанным инсулиновым шприцом в зависимости от густоты. Экстрагируемые пробы перемешивали. Пробирки с химусом вновь взвешивали, определяя таким образом массу пробы. Пробы экстрагировали при температуре 4°C, заморозку проводили при –18°C. Минимальное время экстракции или заморозки составляло 21 сут.

**Основы метода измерения.** Для регистрации ЦА в исследуемых образцах использован 4-метилумбеллиферил- $\beta$ -D-целлобиозид (МУФ-Ц), состоящий из способного к флуоресценции 4-метилумбеллиферата (МУФ) и присоединенного к нему остатка целлобиозы. Содержащийся в образце фермент целлобиогидролаза при взаимодействии с реактивом отщепляет целлобиозид в том же молярном соотношении, что и при гидролизе целлюлозы. При этом высвобождается МУФ, флуоресценцию которого можно зарегистрировать, и, сравнив с флуоресценцией раствора МУФ известной концентрации, выяснить количество вещества ( $\nu$ ) МУФ, образующегося в ходе реакции. Активность фермента рассчитывается как отношение  $\nu$  продукта реакции к ее длительности.

**Сравнение эффективности консервантов химуса.** Было проведено сравнение способов консервации в фосфатном буфере, глицерине и замораживания.

Из опыта работы по исследованию эндоглоканазной активности мелких млекопитающих (Варшавский и др., 2003, 2004) известно, что 86%-ный раствор глицерина в дистиллированной воде успешно консервирует пробы химуса при 4°C, сохраняя их даже при аварийном повышении температуры до 25°C. При этом 86%-ный глицерин экстрагировал эндоглоканазы, входящие в целлюлазный комплекс. Сделано предположение о возможности применения 86%-ного глицерина в качестве консерванта и одновременно экстрагента для проб химуса, используемых при исследовании целлобиогидролазной активности. Для проверки этого предположения был поставлен первый эксперимент (разведочный), при этом во избежание замутнения реакционной смеси использовали низкую концентрацию химуса. Как дополнительный вариант консервации проверяли также заморозку проб химуса. Из слепой кишки лабораторного кролика было отобрано 14 проб содержимого. По 3 пробы химуса экстрагировали в 86% глицерине и в фосфатном буфере, 3 пробы заморозили. Остав-

шиеся 5 проб использовали для контроля гашения флуоресценции. Размороженный химус и жидкую фракцию из глицеринового и буферного экстрактов растворяли в фосфатном буфере так, чтобы конечная концентрация химуса в реакционных пробирках составляла 0.005 г/мл (5 г/л). Измерения проводились на спектрофлуориметре MPF-4. Были также проверены результаты эффективности экстракции ферментов на большей выборке (второй эксперимент). Из слепой кишки фермерского кролика было отобрано 30 проб содержимого. По 10 проб химуса экстрагировали в 86% глицерине и в фосфатном буфере, остальные 10 проб заморозили. Концентрации химуса в реакционной смеси варьировали от 5 до 11 г/л. Измерения проводили на спектрофлуориметре “Флуорат-02-Панорама”.

**Разработка способа освобождения субстрата от гуминовых веществ и пищевых частиц.** Для коррекции подготовки экстрагента использовались 30 проб химуса. Были испытаны разные режимы центрифугирования проб химуса перед измерением ЦА: от 2000 до 5000 об/мин с визуальным контролем осаждения.

**Исследование влияния концентрации химуса на ЦА (третий эксперимент).** Из слепой кишки фермерского кролика было отобрано 20 проб химуса. По 10 проб экстрагировали в 86% глицерине и в фосфатном буфере. После центрифугирования из каждой пробы отбирали по 3 повторности супернатанта, растворяли их в фосфатном буфере так, чтобы конечная концентрация химуса в реакционных кюветах составляла 5, 10 и 15 г/л. Измерения проводили на спектрофлуориметре “Флуорат-02-Панорама”. По результатам измерения была построена математическая модель.

**Анализ данных и построение математической модели.** Весь анализ данных проводили в среде R (R Core Team, 2020), для построения графиков применяли пакет ggplot (Wickham *et al.*, 2020), расширенный собственными функциями, для создания и анализа моделей — пакет lme4 (Bates *et al.*, 2020). Разведочный анализ данных проводили согласно протоколу Жюра (Zuur *et al.*, 2010). В первых двух экспериментах использовали только графический анализ, как в предварительных.

Данные, полученные в третьем эксперименте, представляют собой иерархическую структуру: 10 проб экстрагировалось глицерином, столько же — буфером, из каждой пробирки проводилось по 3 измерения разных концентраций. Такая структура данных и предполагаемая линейная зависимость ЦА от концентрации химуса соответствует линейной модели со смешанными эффектами (ЛММ), где пробирки являются случайным эффектом.

Использование ЛММ как метода анализа в третьем эксперименте диктуется не только струк-

турой данных, но и тем, что такие модели позволяют наилучшим образом учесть взаимодействие различных эффектов, а также допускают нарушения критериев применимости классических методов статистики.

В модели ЦА как функции от ковариат мы предполагали, что ЦА распределена нормально. Фиксированными переменными являются *концентрация химуса* (интервальная) и *экстрагент* (фактор с двумя уровнями). Возможны взаимодействия между фиксированными эффектами, т.е., *экстрагент* × *концентрация химуса*. Чтобы учесть зависимость измерений из одной пробирки, в модель ввели *пробирки* как случайный эффект.

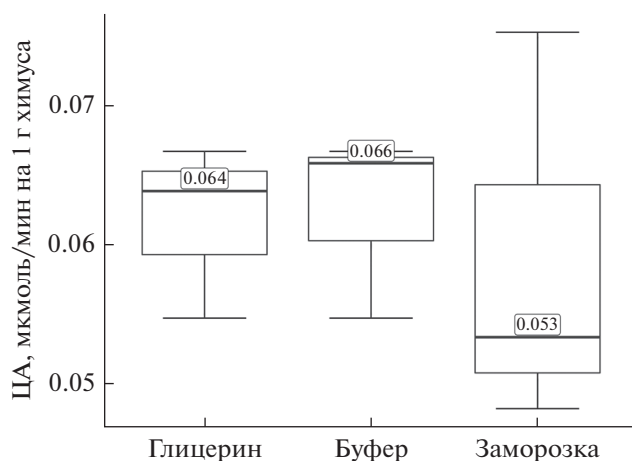
Следует учесть и вложенность факторов: *экстрагент* → *пробирки* → *концентрация химуса*. Обычно в линейных моделях вложенные *фиксированные* эффекты рассматривают просто как взаимодействующие.

Таким образом, формула максимальной модели (все эффекты и их взаимодействия) будет такой:

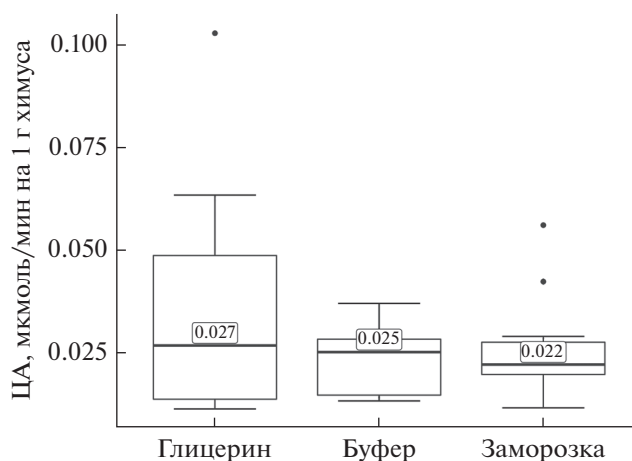
$$cbha_{ij} = \alpha + \beta_1 \times \text{extragent}_{ij} + \beta_2 \times \text{conc}_{ij} + \beta_3 \times \text{extragent}_{ij} \text{conc}_{ij} + \text{sample}_i + \varepsilon_{ij},$$

где:  $cbha_{ij}$  — ЦА  $j$ -го измерения из  $i$ -й пробирки;  $i \in [1, 20]$ ;  $j \in [1, 3]$ ;  $\alpha$  — константа (оно же intercept);  $\beta_n$  — угловые коэффициенты (slopes);  $\text{extragent}_{ij}$  — экстрагент;  $\text{conc}_{ij}$  — концентрация химуса;  $\text{sample}_i$  — пробирка (случайный эффект);  $\varepsilon_{ij}$  — случайная ошибка (остатки модели, “шум”);  $cbha_{ij} \sim N(\mu, \sigma^2)$ ;  $\text{sample}_i \sim N(0, \sigma_{\text{sample}}^2)$ ;  $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$ .

Для диагностики и оптимизации модели применяли сравнение по критерию Акаике с корректировкой для малых выборок (AICc), тест отношения правдоподобия LRT, метод Кенварда–Роджера и параметрический бутстреп, а также графический анализ. Валидацию моделей проводили методом построения графиков их остатков относительно предсказанных значений и относительно каждого предиктора. Помимо вышеперечисленных пакетов R для этого использовали пакеты MuMIn (Bartoń, 2020), pbkrtest (Halekoh, Højsgaard, 2014), performance (Lüdtke *et al.*, 2020), и jtools (Long, 2020). Расчет доверительных и предсказательных интервалов проводили методом параметрического бутстрепса с помощью пакета ciTools (Haman, Avery, 2020). Коэффициенты детерминации  $R^2$  для смешанных моделей рассчитывали по методу Накагавы с расширением Джонсона (Nakagawa, Schielzeth, 2013; Johnson, 2014) с помощью пакета performance.



**Рис. 1.** ЦА симбионтов слепой кишки домашнего кролика, нормированная на 1 г химуса по результатам первого эксперимента.



**Рис. 2.** ЦА симбионтов слепой кишки домашнего кролика, нормированная на 1г химуса по результатам второго эксперимента.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Экстракция целлюлаз из содержимого ЖКТ.** В первом эксперименте результаты измерений активности целлюлаз, экстрагированных 86%-ным глицерином, по медиане практически не отличаются от экстрагированных буфером (рис. 1). ЦА замороженного химуса примерно на 20% меньше, чем в экстрагированных пробах. По сравнению с экстрактами в пробах замороженного химуса отмечается больший разброс результатов измерений, что вызвано взвесью частиц химуса в реакционных пробирках. Таким образом, подтверждается эффективность 86%-ного глицерина в качестве экстрагента и консерванта проб.

Результаты второго эксперимента подтверждают выводы, сделанные по итогам первого. Медианы измерений активности целлюлаз, экстрагированных различными способами, различаются слабо (рис. 2). Уменьшение ЦА в замороженных образцах практически не выражено. Тем не менее, в дальнейшем от заморозки как способа консервации проб решено было отказаться, поскольку в полевых условиях она доступна не всегда. Результаты измерений ЦА во втором эксперименте примерно вдвое меньше, чем в первом, что ожидаемо связано со смешанным рационом фермерского кролика.

**Очистка субстрата.** Для освобождения субстрата от гуминовых веществ и пищевых частиц после испытания разных режимов центрифугирования выбрана оптимальная скорость 5000 об./мин, достаточная для осаждения нерастворимой фракции и в то же время не вызывающая разрушения макромолекул целлюлаз. Четкое разделение фракций происходило за 10 мин. В результате центрифугирования разброс значений ЦА (интерквартильный размах, примерный аналог “трех сигм”) во

втором и третьем экспериментах был относительно невелик, что мы связываем с отсутствием взвеси в реакционной кювете.

**Влияние концентрации химуса на ЦА (третий эксперимент).** Графический анализ результатов второго эксперимента (рис. 3) показал предположительно линейную зависимость ЦА от концентрации химуса в реакционной кювете. Ни графический, ни статистический анализы не подтвердили влияние экстрагента на результаты измерения ЦА. Отсутствие статистически значимого влияния экстрагента согласуется с результатами первого и второго опытов, таким образом, 86%-ный глицерин был признан оптимальным экстрагентом и консервантом проб. Влияние концентрации химуса в реакционной смеси на регистрируемую ЦА подтверждается всеми вариантами модели. В результате анализа итоговая модель зависимости ЦА от концентрации химуса в пробе приобрела следующий вид:

$$cbha_{ij} = -0.024 + 0.021conc_{ij} + a_i + b_{ij} \times conc_{ij} + \varepsilon_{ij},$$

где:  $cbha_{ij}$  – ЦА  $j$ -го измерения из  $i$ -й пробирки;  $i \in [1,19]$ ;  $j \in [1,3]$ ;  $conc_{ij}$  – концентрация химуса;  $a_i \sim N(0,0.058)$  – случайная константа для пробы;  $b_{ij} \sim N(0,0.009)$  – случайный угол наклона для пробы;  $\varepsilon_{ij} \sim N(0,0.032)$  – случайная ошибка (остатки модели, “шум”).

Количество наблюдений (пробирок) в модели  $N = 19$ , число измерений равно 57. Одну пробирку исключили в ходе разведочного анализа как экстремум. Валидация модели не выявила значимых нарушений. Основные параметры модели представлены в табл. 1. В настоящее время для оценки достоверности эффектов смешанных моделей не рекомендуется использовать  $p$ -значения, более

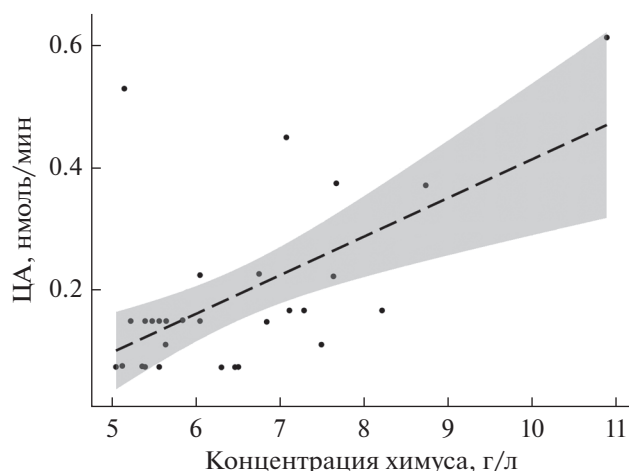


Рис. 3. Предполагаемая зависимость ЦА от концентрации химуса во втором эксперименте.

надежными считаются доверительные интервалы. Влияние эффекта признается достоверным, если доверительный интервал не пересекает нуля (концентрация в табл. 1).

Коэффициент детерминации  $R^2$  в смешанных (многоуровневых) моделях представлен двумя типами – предельным и условным. Предельный  $R_{\text{marginal}}^2$  показывает долю дисперсии, объясненную только фиксированными эффектами, без учета случайных. Условный  $R_{\text{conditional}}^2$  показывает долю дисперсии, объясненную как фиксированными, так и случайными эффектами. В данном случае и предельный (0.622) и условный (0.92) коэффициенты детерминации весьма высоки, т.е., модель объясняет 92% дисперсии, из которых 62% объясняется влиянием концентрации химуса в реакционной кювете.

Графическое представление модели показано на рис. 4. Для проверки качества модели на графике показаны также результаты из второго эксперимента (те же пробы, но случайные концентрации). 23 точки из 29 (79%) попали в 95% интервал ожидания модели.

**Методика флуориметрического измерения целлюлозгидролазной активности в содержимом ЖКТ млекопитающих.** В результате проведенных исследований в исходную методику флуориметрического определения ЦА (Синицын и др., 1990)

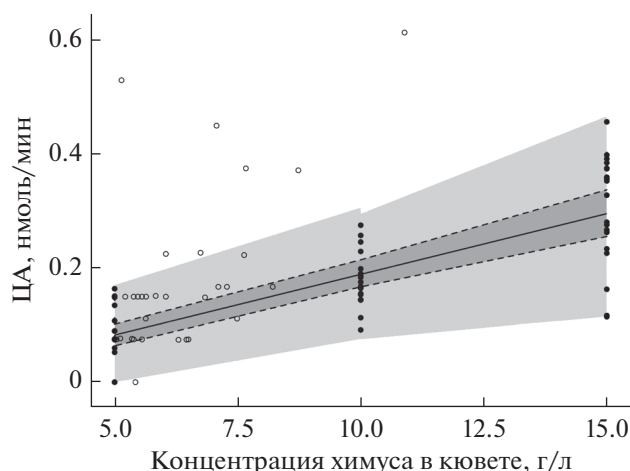


Рис. 4. График итоговой модели с 95% доверительным интервалом (темно-серый) и 95% интервалом ожидания (светло-серый). Незалитые точки отображают измерения из второго эксперимента.

были внесены существенные изменения и для работы с химусом составлен следующий протокол:

1) Фосфатный буфер pH 6.8–7.0 (0.15 моль/л) готовится смешиванием 0.15-молярных растворов 12-водного  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  в пропорции  $\approx 1 : 1$ .  $M(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}) = 358$  г/моль;  $M(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 136$  г/моль; соответственно для получения 500 мл раствора надо растворить  $0.15 \times 0.5 \times 358 = 26.85$  г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  и  $0.15 \times 0.5 \times 142 = 10.65$  г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

2) Запасной раствор МУФ концентрацией  $10^{-7}$  моль/мл готовится разведением 2 мг МУФ в 113.6 мл фосфатного буфера pH 6.8–7.0.

3) Запасной раствор МУФ-Ц концентрацией  $10^{-6}$  моль/мл готовится разведением 5 мг МУФ-Ц в 0.193 (0.2) мл диметилсульфоксида (ДМСО), затем доливают 9.478 (9.5) мл буфера (концентрация ДМСО в итоге  $\approx 2\%$ ). Конечная концентрация МУФ в калибровочных пробах  $10^{-9}$  моль/мл, МУФ-Ц в рабочих пробах  $10^{-7}$  моль/мл (запас на 2 порядка).

На спектрофлуориметре MPF-4 (Hitachi, Япония):

4) Калибровка. В мерную кювету вносят 0.2 мл глицеринового экстракта пробы химуса, доливают буфер до 2 мл и добавляют 20 мкл раствора МУФ. Снимают показания прибора при следующих длинах волн ( $\lambda$ ):  $\lambda_{\text{возбуждения}} = 368$  нм и  $\lambda_{\text{флуоресценции}} = 446$  нм. В случае слишком больших или малых значений меняют усиление прибора

Таблица 1. Фиксированные эффекты итоговой модели

Коэффициент	Оценка	Стандартная ошибка	2.5%	97.5%
Константа	-0.024	0.017	-0.058	0.010
Концентрация	0.021	0.002	0.017	0.026

и/или концентрацию МУФ. Рассчитывают коэффициент:

$$K = \frac{C}{D},$$

где:  $C$  – концентрация МУФ (в мкмоль/мл),  $D$  – показания прибора.

5) Измерение. В мерную кювету вносят 0.2 мл раствора МУФ-Ц, доливают 1.6 мл буфера и вносят  $\approx 0.2$  мл экстракта пробы химуса (в зависимости от желаемой его концентрации). Перемешивают. Снимают показания прибора (точка  $t = 0$ ). Реакционную смесь переливают в чистую пробирку и инкубируют при  $38-42^\circ\text{C}$  в течение 1 ч, снимая показания прибора каждые 15 мин. Активность фермента (в мкмоль/мин) рассчитывают по формуле:

$$A_t = \frac{(D_t - D_0)KV}{t},$$

где:  $D_t$  – показания прибора в момент времени  $t$ ,  $D_0$  – показания прибора в момент времени 0,  $V$  – объем реакционной смеси в мл,  $t$  – время реакции в минутах.

Выбирают максимальную  $A_t$ , и в дальнейших измерениях используют это время инкубации.

На спектрофлуориметре “Флуорат-02-Панорама” (Россия):

6) Калибровка. Глицериновый экстракт пробы химуса центрифугируют 5–15 мин при 5000 об./мин. В мерную кювету вносят 0.2 мл супернатанта, доливают буфер до 2 мл и измеряют сигнал фонового раствора ( $\Phi$ ) согласно инструкции к прибору при следующих длинах волн ( $\lambda$ ):  $\lambda_{\text{возбуждения}} = 368$  нм и  $\lambda_{\text{флуоресценции}} = 446$  нм. В случае слишком больших или малых значений меняют усиление прибора (F1). Затем градуируют спектрофлуориметр при том же усилении согласно инструкции, доливая в кювету МУФ в диапазоне концентраций  $10^{-4} - 2 \times 10^{-2}$  мкмоль/мл. Объем запасного раствора МУФ ( $V_{\text{МУФ}}$ ), который необходимо долить в кювету для получения конечной концентрации  $C_{\text{МУФ}}$  в растворе, рассчитывается по формуле:

$$V_{\text{МУФ}} = \frac{20C_{\text{МУФ}}}{1 - 10C_{\text{МУФ}}}.$$

Достаточно 3 точек калибровки.

7) Действия аналогичны первому варианту, но, поскольку в данном случае спектрофлуориметр показывает непосредственно концентрацию ( $C$ ), формула расчета активности другая:

$$A_t = \frac{(C_t - C_0)V}{t},$$

где:  $C_t$  – концентрация образовавшегося МУФ в момент времени  $t$  (в мкмоль/мл),  $C_0$  – концентра-

ция образовавшегося МУФ в момент времени 0 (в мкмоль/мл),  $V$  – объем реакционной смеси в мл,  $t$  – время реакции в минутах.

Возможно инкубировать реакционную смесь непосредственно в измерительных кюветах, без переливания. Оптимальное время по результатам  $\approx 100$  измерений равно 15 мин.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные испытания активности целлюлаз, проявляющейся в разных экспериментальных условиях, позволили выделить оптимальные позиции для сбора и дальнейшей обработки материала. А именно, оптимальной средой для консервации и экстракции целлюлазного комплекса оказался 86%-ный глицерин. При идентичных с чистым буфером значениях ЦА (рис. 1, 2) глицерин обеспечивает консервацию образцов, в то время как взвесь содержимого пищеварительного тракта в нейтральном буфере представляет собой хорошую питательную среду для различных микроорганизмов. Кроме того, экстракция целлюлаз глицерином позволяет использовать одни и те же пробы для измерения как эндоглоканазной, так и целлобиогидролазной активности. От заморозки образцов окончательно отказались. Помимо очевидных технических трудностей при организации заморозки в полевых условиях и транспортировке замороженных проб, наблюдается тенденция к снижению в них ЦА (рис. 1, 2), что может быть вызвано частичной инактивацией ферментов воздействием низких температур.

По сравнению с лабораторным кроликом, питающимся сеном, ЦА в слепой кишке фермерского кролика, содержавшегося на смешанном рационе, снижена примерно вдвое (рис. 1, 2): сказываются различия в составе корма. Гидролиз целлюлозы – энергозатратный процесс, и, при наличии в рационе легкоусвояемых нутриентов, синтез целлюлаз, предположительно, снижается.

Взвесь частиц химуса в реакционной смеси представляет серьезную проблему при измерениях, непредсказуемо пересекая световые потоки спектрофлуориметра. В первом опыте концентрация химуса в реакционной кювете была выбрана равной 5 г/л, в первую очередь, с целью минимизировать помутнение реакционной смеси. Центрифугирование позволило увеличить эту концентрацию примерно вдвое без видимого помутнения, и во втором опыте мы использовали случайные значения из диапазона 5–11 г/л. Тем не менее, полного осаждения частиц химуса не происходит, и при концентрации 15 г/л разброс показаний прибора растет (рис. 4). Исходя как из фактических данных, так и из предсказаний модели, оптимальной для дальнейшего применения методики можно считать концентрацию 10 г/л (0.01 г/мл) хи-

муса в кювете, что примерно соответствует 0.2 г химуса в полевой пробе объемом 2 мл. При отборе проб химуса следует учитывать, что целлюлазный комплекс фиксирован на твердом субстрате — частицах содержимого пищеварительного тракта, поэтому минимально допустимый объем пробы зависит от гомогенности химуса. Предлагаемая методика оптимизирована для использования проб мелкодисперсного химуса от животных с высокой степенью измельчения корма зубами и малого объема проб, т. е., в первую очередь мелких млекопитающих-фитофагов.

Скорость ферментативной реакции при избытке субстрата зависит в т. ч. и от концентрации фермента, сначала увеличиваясь прямо пропорционально, затем выходя на плато при насыщении (Sattler *et al.*, 1989). График зависимости абсолютной ЦА (скорости реакции) от концентрации химуса во втором эксперименте показал близкую к линейной корреляцию (рис. 3). Построенная математическая модель позволила проанализировать влияние экстрагента, концентрации химуса в реакционной смеси и случайного разброса (фактор пробы) на результаты измерения ЦА. Что касается экстрагента, модель подтверждает выводы предыдущих двух опытов — целлюлазы экстрагируются 86%-ным глицерином в достаточной степени, чтобы различий с буферным раствором практически не наблюдалось. Наблюдаемая на рис. 4 близкая к линейной корреляция ЦА и концентрации химуса показывает, что в условиях эксперимента насыщение реакционной смеси ферментом не достигается. Следовательно, для повышения чувствительности метода можно повысить концентрацию химуса и, соответственно, целлюлогидролаз в кювете, где проходит реакция, до 10 г/л.

В нескольких пробирках отмечалось сильное влияние случайного эффекта. Это отражает неравномерное распределение макромолекул целлюлазного комплекса по слепой кишке. Для компенсации разброса данных можно порекомендовать отбор большего количества проб из одного отдела пищеварительного тракта животного размером с кролика или же перемешивать химус в слепой кишке мелких грызунов. Высокие коэффициенты детерминации  $R_{\text{marginal}}^2$  и  $R_{\text{conditional}}^2$  показывают хорошее соответствие модели экспериментальным данным. В то же время около 30% дисперсии полученных результатов модель не объясняет. Можно предположить, что это опять-таки связано с неравномерностью распределения целлюлаз в химусе. Кроме того, дополнительную вариативность создает неполное осаждение частиц химуса при центрифугировании, что ограничивает возможность увеличения чувствительности метода путем повышения концентрации фермента в измерительной кювете.

По предварительным данным, целлюлазная активность достаточно устойчива и сохраняется в ЖКТ длительное время в широком диапазоне температуры окружающей среды. Но этот вопрос требует дополнительного специального исследования.

С учетом отмеченных ограничений разработанная методика достаточно удобна при изучении целлюлазной активности в пищеварительном тракте диких животных-фитофагов, так как позволяет отбирать пробы в полевых условиях. При этом одни и те же пробы можно использовать при измерении как эндогликканазной, так и целлюлогидролазной активности.

Таким образом, на основании проведенного анализа можно рекомендовать разработанную схему сбора и обработки материала для широкого скрининга ЦА у фитофагов со смешанной и кишечной ферментацией. Накопление подобных данных позволит точнее оценивать актуальную и потенциальную возможности фитофагов, использовать лигноцеллюлозные корма в качестве нутриента. Поскольку именно структурные углеводы служат основным ограничителем кормового диапазона у фитофагов, знание особенностей их пищеварения может быть полезным в экологических прогнозах.

**Благодарности.** Авторы благодарят М.Л. Рабиновича, принимавшего непосредственное участие в разработке методики.

**Этические нормы.** Это исследование было проведено в соответствии с этикой и благополучием животных. Все исследования выполняли в соответствии с Законом о ветеринарной и медицинской деятельности и Национальным законом о защите животных.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Варшавский А.А., Наумова Е.И., Тихонов И.А. Особенности функционирования целлюлолитических симбионтов в преджелудке и слепой кишке серых полевок (*Microtus arvalis* и *M. rossiaemeridionalis*) // Зоол. журн. 2004. Т. 83. № 11. С. 1299–1304.
- Варшавский А.А., Пузаченко А.Ю., Наумова Е.И., Костина Н.В. Ферментативная активность микрофлоры пищеварительного тракта обыкновенного слепыша *Spalax microphthalmus* (Spalacidea, Rodentia) // ДАН. 2003. Т. 392. № 4. С. 564–567.
- Давлетова Л.В., Капралова Л.Т., Термелева А.Г. Морфофункциональное изучение органов пищеварения копытных. М.: Наука, 1986. 58 с.
- Лактионов К.С. Исследование целлюлозолитической активности цекальных бактерий у кроликов методом *in vivo* // Вестник Орел ГАУ. 2012. № 1(34). С. 122–123.
- Рабинович М.Л., Мельник М.С. Прогресс в изучении целлюлолитических ферментов и механизм биодegradации высокоупорядоченных форм целлюлозы // Успехи биол. химии. 2000. Т. 40. С. 205–266.



- Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов // Итоги науки и техники, сер. “Биотехнология”. М.: ВИНТИ, 1990. 152 с.
- Bartoń K. MuMIn: Multi-Model Inference, 2020. <https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>.
- Bates D., Maechler M., Bolker B., Walker S. lme4: Linear Mixed-Effects Models using Eigen and S4, 2020. <https://github.com/lme4/lme4/>.
- Coleman D.J., Studler M.J., Naleway J.J. A long-wavelength fluorescent substrate for continuous fluorometric determination of cellulase activity: resorufin- $\beta$ -D-cellobioside // Anal. biochem. 2007. V. 371. № 2. P. 146–153.
- Goering H.K., Van Soest P.J. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Application) // Agric. Handbook. 1970. № 379.
- Halekoh U., Højsgaard S. A Kenward-Roger Approximation and Parametric Bootstrap Methods for Tests in Linear Mixed Models – The R Package pbkrtest // Journal of Statistical Software. 2014. V. 59. № 9. P. 1–30.
- Haman J., Avery M. ciTools: Confidence or Prediction Intervals, Quantiles, and Probabilities for Statistical Models, 2020. <https://github.com/jthaman/ciTools>.
- Johnson P.C.D. Extension of Nakagawa & Schielzeth’s  $R^2_{GLMM}$  to random slopes models // Methods in Ecol. and Evol. 2014. V. 5. № 9. P. 944–946.
- Long J.A. jtools: Analysis and Presentation of Social Scientific Data, 2020. <https://jtools.jacob-long.com>
- Lüdtke D., Makowski D., Waggoner P., Patil I., Ben-Shachar M.S. performance: Assessment of Regression Models Performance, 2020. <https://easystats.github.io/performance/>.
- Nakagawa S., Schielzeth H. A general and simple method for obtaining  $R^2$  from generalized linear mixed-effects models // Methods in Ecol. and Evol. 2013. V. 4. № 2. P. 133–142.
- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2020. <https://www.R-project.org/>.
- Sakaguchi E., Itoh H., Uchida S., Horigome T. Comparison of fibre digestion and digesta retention time between rabbits, guinea-pigs, rats and hamsters // British J. Nutrition. 1987. V. 58. № 1. P. 149–158.
- Sakaguchi E., Kaizu K., Nakamichi M. Fibre digestion and digesta retention from different physical forms of the feed in the rabbit // Comp. Biochem. and Physiol. Part A: Physiology. 1992. V. 102. № 3. P. 559–563.
- Sattler W., Esterbauer H., Glatter O., Steiner W. The effect of enzyme concentration on the rate of the hydrolysis of cellulose // Biotech. and bioengin. 1989. V. 33. № 10. P. 1221–1234.
- Sharma A., Tewari R., Rana S.S., Soni R., Soni S.K. Cellulases: classification, methods of determination and industrial applications // Applied Biochem. and Biotech. 2016. V. 179. № 8. P. 1346–1380.
- Tokuda G., Lo N., Watanabe H. Marked variations in patterns of cellulase activity against crystalline- vs. carboxymethyl-cellulose in the digestive systems of diverse, wood-feeding termites // Physiol. Entomol. 2005. V. 30. № 4. P. 372–380.
- Wickham H., Chang W., Henry L., Pedersen T.L., Takahashi K., Wilke C., Woo K., Yutani H., Dunnington D. ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics, 2020. <https://CRAN.R-project.org/package=ggplot2>.
- Zuur A.F., Ieno E.N., Elphick C.S. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems // Methods in Ecol. and Evol. 2010. V. 1. № 1. P. 3–14.

## Fluorimetric Method of Cellobiohydrolase Activity Estimation in Digestive Tract of Small Herbivorous Mammals

A. A. Varshavskiy<sup>1, #</sup> and E. I. Naumova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Leninsky prospect, 33, Moscow, 119071 Russia

<sup>#</sup>e-mail: ulvhare@sev-in.ru

A fluorimetric method for the cellobiohydrolase activity investigation, originally developed for pure cultures, has been modified for using in samples of digestive tract content of small mammals captured in nature. Several methods of the field samples’ preservation were studied. 86% glycerin was recognized as an optimal preservative. A mathematical model of measurement results of the cellobiohydrolase activity dependence on the concentration of chyme in a sample is constructed. The model confirmed the effect of the chyme concentration on measurement results in the range of 5–15 g/L. The optimal concentration of chyme can be considered equal to 10 g/L. It means a charge of 0.2 g chyme placed in 1 ml of 86% glycerin for a sample that can be easily done in the field.

**Keywords:** small herbivorous mammals, digestion, cellulases, fluorimetry

---

---

**ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ  
И ЧЕЛОВЕКА**

---

---

УДК 616-001.17:615.83:537.5.001.6(599.323.4)

**СТИМУЛЯЦИЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ ОЖОГОВЫХ РАН У КРЫС  
НАНОСЕКУНДНЫМ ИМПУЛЬСНО-ПЕРИОДИЧЕСКИМ  
МИКРОВОЛНОВЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ****© 2022 г. А. А. Гостюхина\*, \*\*, \*\*\*, @, А. В. Самойлова\*, \*\*\*, \*\*\*\*, М. А. Большаков\*, \*\*\*,  
В. М. Мочалова\*\*\*, К. В. Зайцев\*\*, О. П. Кутенков\*, В. В. Ростов\****\*ФГУН Институт сильноточной электроники СО РАН, пр. Академический, 2/3, Томск, 634055 Россия**\*\*Томский НИИКиФ ФФГБУ ФНКЦ МРиК ФМБА России, ул. Р. Люксембург, д. 1, г. Томск, 634009 Россия**\*\*\*ФГАОУВО “Национальный исследовательский Томский государственный университет”,  
пр. Ленина, 36, Томск, 634050 Россия**\*\*\*\*ГБОУВПО “Сибирский государственный медицинский университет” Министерства здравоохранения  
Российской Федерации, Московский тракт, 2, Томск, 634050 Россия**@E-mail: antariks-tomsk2015@yandex.ru**Поступила в редакцию 20.04.2021 г.**После доработки 18.05.2021 г.**Принята к публикации 05.09.2021 г.*

Изучено влияние наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения (ИПМИ, 10 ГГц, длительность импульсов 100 нс, частота повторения импульсов 8 Гц, пиковые плотности потока мощности (пППМ) 140 и 1500 Вт/см<sup>2</sup>) на регенерацию ожоговых ран у крыс в динамике. Установлено, что после 4-кратного локального облучения ран с интенсивностями 140 и 1500 Вт/см<sup>2</sup> при частоте повторения импульсов 8 Гц с 1 по 14 день заживление ран в контрольной и облученных группах значимо не отличалось. Статистически значимое ускорение заживления ожоговых ран выявлялось с 19 суток. При этом с 12-ого дня наблюдалось частичное отделение сформировавшегося струпа. Эпителизация облученных ран наблюдалась с 24 по 28 сут. Эффективность воздействия ИПМИ с пППМ 140 Вт/см<sup>2</sup> оказалась выше в сравнении с облучением пППМ 1500 Вт/см<sup>2</sup>.

*Ключевые слова:* ожоговая рана, наносекундные импульсы, микроволновое излучение, крысы

**DOI:** 10.31857/S1026347022050080

Эффективное восстановление кожных покровов у человека, поврежденных в результате различных термических травм, является актуальной медико-биологической проблемой (Алексеев, Бобровников, 2012; Алексеев и др., 2016). Несмотря на значительное количество работ, посвященных лечению таких повреждений посредством хирургических, фармакологических и других методов, а также стимуляции регенерации ран с использованием различных физических факторов (Мельникова и др., 2010; Еремин и др., 2012; Звягинцева и др., 2014; Стручков и др., 2015; Самаева, Пак, 2017), из-за их недостаточной эффективности или сложности используемых процедур вопросы успешной терапии сохраняют свою актуальность. Одним из перспективных и оригинальных методов восстановления ожоговых повреждений может быть использование низкоинтенсивных электромагнитных факторов. Определенный интерес представляют данные о ранозаживляющем действии

импульсных радиочастотных излучений (Гапеев, Чемерис, 2007; Athanasiou *et al.*, 2007; Strauch *et al.*, 2009; Гапеев, 2012), в частности, наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения (ИПМИ), которое при определенных параметрах воздействия способно стимулировать репаративную регенерацию полнослойной кожной раны у лабораторных мышей (Князева и др., 2011). Возможным механизмом стимуляции заживления ран под влиянием воздействия такого излучения, как полагают Страух с соавт., является активация Ca<sup>2+</sup>-кальмодулинзависимой продукции окиси азота (Strauch *et al.*, 2009). По некоторым данным, положительные эффекты ранозаживления с использованием крайне высокочастотного воздействия объясняются понижением интенсивности воспалительных процессов за счет усиления микроциркуляции в раневом очаге и прилежащих тканях (Лушников и др., 2002, 2003; Князева и др., 2011; Гапеев, 2012). Есть данные, что воздействие

импульсным радиочастотным излучением используется в косметической хирургии для ускорения заживления ран и снятия болевых ощущений в постоперационный период (Strauch *et al.*, 2009). Известно, что помимо болевых ощущений, причиной отрицательных исходов в хирургии и терапии глубоких ожогов кожи является протекающий воспалительный процесс в ране (Полутова и др., 2011). Предполагается, что перечень возможных вариантов действия исследуемого наносекундного ИПМИ, может быть расширен, в том числе, и за счет непосредственного активирующего влияния на клетки, участвующие в процессе регенерации ран (лимфоциты, фибробласты, стволовые клетки) (Князева и др., 2011). Таким образом, стимуляция заживления термических ожогов с помощью электромагнитных факторов, в том числе, наносекундного ИПМИ, представляется актуальной как с теоретической точки зрения в плане выяснения молекулярно-клеточных и физиологических механизмов ранозаживляющего действия, так и с практической. Для изучения стимулирующих эффектов наносекундных импульсных микроволн при заживлении термических травм удобным для исследования модельным объектом представляются лабораторные крысы, геном которых на 90% имеет сходство с геномом человека (Chen *et al.*, 2011). По этой причине возможные механизмы стимулирующего влияния, выявленные на лабораторных крысах, можно будет экстраполировать на процессы регенерации ожогов кожи у человека.

Цель настоящей работы — изучить возможности стимулирования регенерации кожных ожоговых ран у лабораторных крыс с помощью наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование выполнено на 30 половозрелых крысах—самках породы “Wistar” массой 230–250 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном световом режиме и на стандартном рационе со свободным доступом к воде и пище. Все процедуры с животными выполняли в одно и то же время (с 9:00 до 11:00). Исследование проводили в соответствии с этическими нормами работы с лабораторными животными (ETS № 123, 2007) и санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (Правила лабораторной практики в Российской Федерации). На проведение исследования получено разрешение Комиссии по биоэтике

Биологического института НИ ТГУ (протокол № 15 от 14.06.2019 г.).

Экспериментальные животные случайным образом были разделены на три группы по 10 особей в каждой:

1. Контрольная группа ( $n = 10$ ) — крысы, которых после моделирования термического ожога содержали в стандартных условиях вивария и не подвергали воздействию ИПМИ;

2. Опытная группа № 1 ( $n = 10$ ) — крысы, которых после моделирования термического ожога подвергали однократно в течение 4-х дней локальному воздействию наносекундным ИПМИ с пППМ 140 Вт/см<sup>2</sup> и с частотой повторения импульсов 8 Гц.

2. Опытная группа № 2 ( $n = 10$ ) — крысы, которых после моделирования термического ожога подвергали однократно в течение 4-х дней локальному воздействию наносекундным ИПМИ с пППМ 1500 Вт/см<sup>2</sup> и с частотой повторения импульсов 8 Гц.

Выбор режимов воздействия (длительность, пППМ, частота повторения) основан на результатах предыдущего исследования, как наиболее эффективно влияющих на скорость репаративной регенерации полнослойных кожных ран (Князева и др., 2011).

**Моделирование термических ожогов.** За сутки до моделирования ожога на дорсальной поверхности тела крысы осуществляли депиляцию участка кожи путем выбривания электрической ветеринарной машиной. Бритье и моделирование ожога проводили под CO<sub>2</sub> наркозом. Термическая рана создавалась прикладыванием без усилия на 30 с, разогретого до 100°C металлического стержня диаметром 2 см к поверхности кожи в межлопаточной области. Площадь повреждения в контрольной и опытных группах составляла, в среднем, 340 ± 18 мм<sup>2</sup>, что соответствовало 8–9% от площади поверхности тела.

В течение всего эксперимента крыс по две особи содержали в специальных клетках, разделенных между собой прозрачной перегородкой для исключения контакта животных друг с другом и взаимного влияния на процесс заживления ожоговой раны. Наблюдение за процессом заживления ран после 4х-кратного облучения осуществляли в динамике у контрольных и опытных крыс вплоть до образования коллоидного рубца. Динамику заживления термических ожогов оценивали с помощью электронного штангенциркуля по уменьшению площади участка поврежденной кожи (Князева и др., 2011; Александрова, 2014; Имашева, 2014), что было фиксировано фотокамерой Sony-DSC-F717 (Япония) с последующим анализом

фотографий (пакет программ Imageanalyzer). Полученные результаты измерения площади поверхности ожоговой раны облученных животных сравнивали с аналогичными показателями в контрольной группе крыс.

**Облучение термических ожогов.** Через 5 ч после формирования ожога ежедневно в течение 4-х последующих дней лабораторные крысы подвергали однократному воздействию наносекундным ИПМИ (4000 импульсов за сеанс/день) с интенсивностями 140 и 1500 Вт/см<sup>2</sup> при частоте повторения импульсов 8 Гц. Для локального воздействия на термическую рану и устранения возможности облучения всего организма остальную часть тела животных укрывали радиопоглощающим материалом. Продолжительность однократного облучения с указанными параметрами воздействия составляла 8 мин. В качестве источника наносекундного ИПМИ использовали импульсный лабораторный генератор на основе магнетрона МИ-505 (изделие серийного производства ОАО “Тантал”, Россия, несущая частота 10 ГГц, выходная пиковая мощность 180 кВт, длительность импульсов на половинном уровне мощности 100 нс). Использованные пиковые интенсивности (140 и 1500 Вт/см<sup>2</sup>) фиксировались по стандартной методике на основе антенных измерений и калориметрических калибровок (Klimov *et al.*, 2008). Во время воздействий животных в специальных пластиковых контейнерах диаметром 10 см и длиной 30 см помещали на расстоянии 20 см от рупора антенны генератора, в зоне сформировавшейся волны ИПМИ. При радиочастотном электромагнитном воздействии возможен нагрев тканей и, соответственно, повышение температуры облучаемой ткани. Поэтому во время воздействия с помощью волоконно-оптического термометра МТ-4МО-1 (Россия) осуществляли температурный контроль. При использованных интенсивностях ИПМИ температура нагрева тканей в области раны не превышала 0.03–0.05° градуса при 140 Вт/см<sup>2</sup> и 0.13° – при 1500 Вт/см<sup>2</sup>.

**Анализ гематологический показателей.** Для оценки состояния воспалительного процесса ожоговых ран в ходе эксперимента каждые 5–7 дней проводили гематологический анализ крови крыс (содержание гемоглобина, количество эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов и их субпопуляций) с помощью ветеринарного гематологического анализатора РСЕ-90 Vet (“HighTechnology”, США). Забор крови осуществляли под СО<sub>2</sub>-наркозом через разрез десны в сухую чистую пробирку Microvette (tri-Kallium-EDTA, Germany).

**Статистический анализ данных.** Расчет площади поверхности тела у крыс проводили по форму-

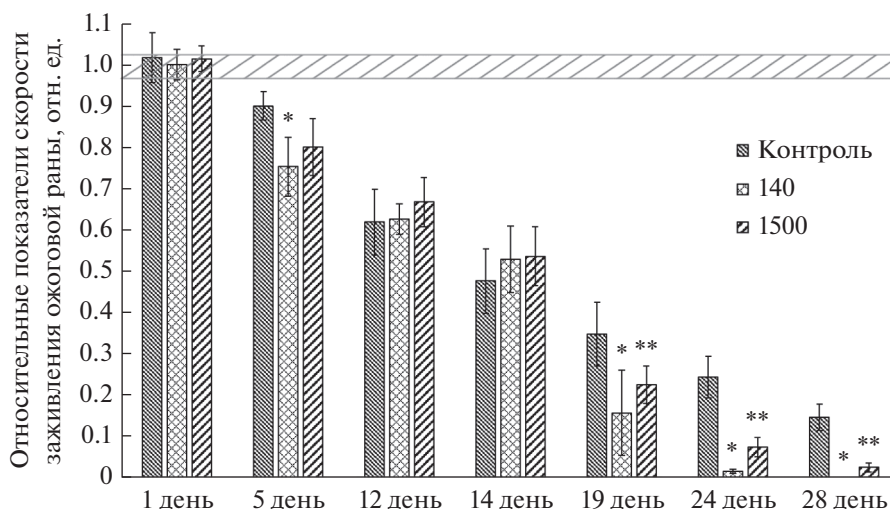
ле К. Миех (K. Meeh), в модификации Д.А. Гилпин (D.A. Gilpin) (Gilpin, 1996; Ковальчук, 2015):  $[S = k \times W^{2/3}]$ , где  $S$  – площадь поверхности тела, см<sup>2</sup>;  $W$  – масса тела животного, кг;  $k$  – константа Михаэлиса. Площадь раны рассчитывали по методу точечного счета, путем измерения минимального и максимального диаметра раны и нахождения их полусуммы (Автандилов, 1990). Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием возможностей программы Statistica 8.0 for Windows. Полученные результаты представлялись в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки среднего арифметического ( $M \pm m$ ) для всех групп экспериментальных животных в динамике. Значимость различий величин между контрольными и облученными показателями определяли с помощью непараметрического  $U$ -критерия Манна–Уитни. Критический уровень значимости различий  $p$  при проверке статистических гипотез принимался равным 0.05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В проведенных экспериментах у всех подопытных крыс в результате использованного термического воздействия формировался ожог III степени, характеризовавшийся поражением всей толщи кожи. Кожа на месте ожоговой раны была плотная и неподвижная. Ожоговые травмы представляли собой овальные раны, с красно-коричневым оттенком, по краям которых отмечалась зона гиперемии. У этих животных в течение первых часов после формирования ожога наблюдалась вялость, нарушение координации движения, отказ от еды и питья.

У крыс контрольной группы, не подвергавшиеся воздействию ИПМИ, заживление ожогов представляло собой монотонное уменьшение площади поверхности ран с 1 по 30 день исследования. При этом наблюдалось длительное сохранение струпа, который отпадал, начиная с 16 дня после нанесения термической травмы. По истечению 24–28 сут у животных в группах регистрировали частичную или полную эпителизацию раны.

У облученных крыс после 4-кратного локального воздействия на ожоговые раны ИПМИ с интенсивностью 140 Вт/см<sup>2</sup> на начальных этапах динамика ранозаживления значимо не отличалась от контрольной группы (рис. 1). Но с 19 сут эксперимента у облученных животных регистрировали статистически значимое уменьшение площади раны относительно контрольной группы с полным заживлением всех ожогов к 28 суткам эксперимента. Кроме того, у облученных крыс, начиная с 12 дня, после нанесения ожога, наблюдалось



**Рис. 1.** Динамика уменьшения поверхности ожоговых ран у крыс, облученных наносекундным ИПМИ с частотой повторения импульсов 8 Гц и интенсивностями 140 и 1500 Вт/см<sup>2</sup> и. Примечание: \* – различия статистически значимы по отношению к показателям облученных животных наносекундным ИПМИ с пППМ 140 Вт/см<sup>2</sup> ( $p \leq 0.05$ ); \*\* – с пППМ 1500 Вт/см<sup>2</sup> ( $p \leq 0.05$ ).

частичное отделение сформировавшегося струпа. К 24 сут отмечалась эпителизация облученных ран с полным ее завершением у всех животных на 28 день исследования (рис. 2).

У крыс, облученных наносекундным ИПМИ с большей интенсивностью 1500 Вт/см<sup>2</sup>, с 1-ого и 14 день исследования площадь раны не отличалась от таковой в контрольной группе (рис. 1). Статистически значимое уменьшение раневой площади наблюдали с 19 дня после нанесения ожога с окончательным заживлением к 30 суткам исследования. На 19-й день после нанесения ожога на фоне ускоренного уменьшения площади раневой поверхности сформировавшийся струп отпадал. При сравнении результатов ранозаживления у обеих облученных групп выяснилось, что воздействие с меньшей интенсивностью (пППМ 140 Вт/см<sup>2</sup>) способствует более эффективному уменьшению площади раневой поверхности (рис. 2). Таким образом, полученные результаты указывают на то, что ИПМИ с использованными параметрами ускоряет процессы ранозаживления.

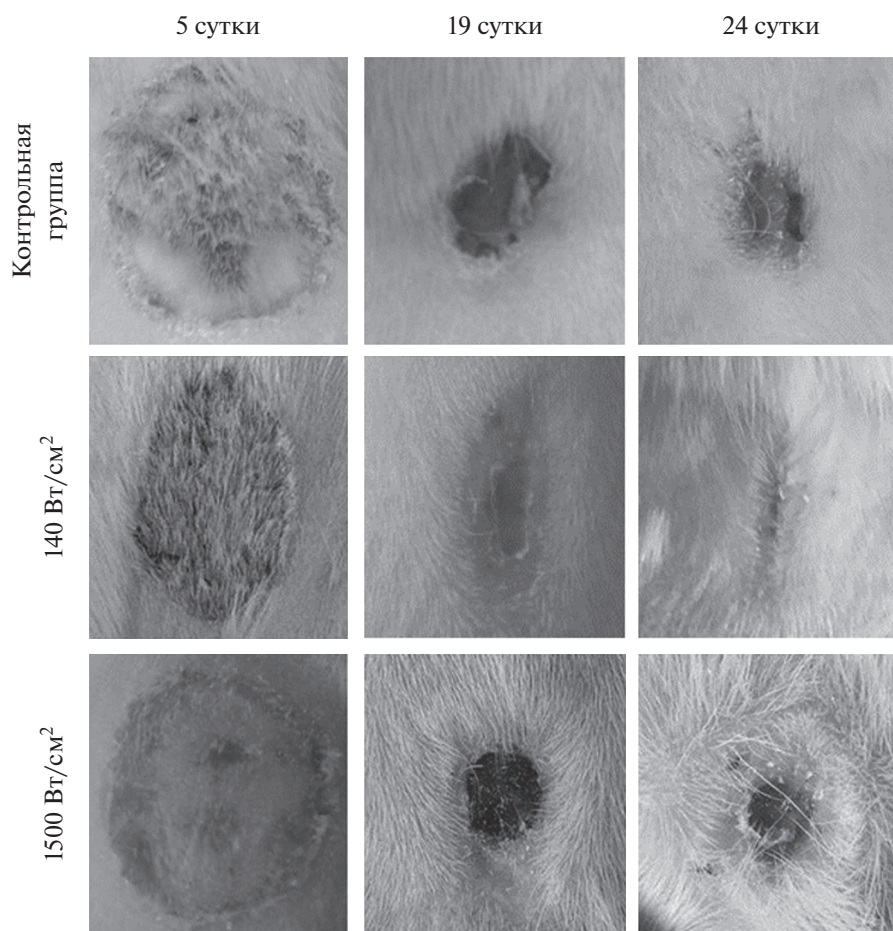
Из литературных данных известно, что при ожоге, который занимал более 10% поверхности тела, наблюдаются значительные изменения в составе крови, она заметно сгущается, нарушается обмен веществ (Шнякина и др., 2017). Любая травма, в том числе и термическая, сопровождается развитием интоксикации в организме, поскольку, кров, в первую очередь, подвергается действию токсических веществ, возникших в очаге поражения. Известно, что процесс ранозаживления сопровождается физиологическими сдвигами показателей

циркулирующей крови в организме человека и животных (Мамонтова, 2006; Ажикова, Журавлева, 2016). С учетом этого, было проведено измерение гематологических показателей крови крыс, анализ которого показал, что во все исследуемые сроки эксперимента как в контрольной, так и в опытных группах отсутствовали статистически значимые изменения количества форменных элементов крови относительно физиологической нормы (табл. 1). При этом наблюдалась тенденция к увеличению количества гранулоцитов, которые способствуют стимуляции регенерации тканей в месте ранения, обеспечивают защиту от инфекции и участвуют в поддержании кровотока и трофики поврежденных тканей.

Возможной причиной отсутствия статистически значимых изменений состава крови у животных контрольной группы является относительно небольшая (8–9%) площадь ожоговой поверхности и, соответственно, меньшее количество токсических веществ, возникших в очаге поражения для развития полноценного воспалительного процесса. Применительно к облученным животным можно допустить, что воздействие ИПМИ на ожоговые раны уже в первые часы после нанесения травмы оказывает стимулирующее действие на восстановительные процессы в ране и вызывает снижение воспалительной реакции.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как следует из полученных результатов, воздействие ИПМИ на ожоговые раны способствует



**Рис. 2.** Фотографии процесса заживления кожной ожоговой раны у контрольных и облученных крыс на 5, 19 и 24 сут эксперимента.

ускорению их регенерации. При этом можно отметить ряд обстоятельств, выявившихся в результате проведенного исследования.

Считается (Алексеев, Бобровников, 2012; Алексеев и др., 2016; Самаева, Пак, 2017), что скорость деления клеток строго лимитирована поэтому,

за счет усиления пролиферации невозможно ускорить сроки заживления ожоговых ран. Тем не менее, создание определенных оптимальных условий для ускорения процесса регенерации, по-видимому, в принципе возможно посредством определенных корректирующих воздействий. Примером подобного, как было показано (Бессонов и др.,

**Таблица 1.** Содержание форменных элементов в крови крыс на 1, 5, 12 и 19 день после моделирования термического ожога

	Лейкоциты ( $\times 10^9/\text{л}$ )			Гранулоциты ( $\times 10^9/\text{л}$ )			Эритроциты ( $\times 10^{12}/\text{л}$ )		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1 сутки	$9.8 \pm 2.1$	$10.6 \pm 1.3$	$8.8 \pm 0.4$	$3.6 \pm 0.6$	$4.1 \pm 0.8$	$3.6 \pm 0.1$	$8.3 \pm 0.2$	$8.3 \pm 0.5$	$8.9 \pm 0.2$
5 сутки	$7.7 \pm 1.0$	$9.3 \pm 1.7$	$10.8 \pm 0.8$	$2.5 \pm 0.4$	$4.2 \pm 0.1$	$4.5 \pm 0.4$	$7.8 \pm 0.5$	$8.6 \pm 0.2$	$8.4 \pm 0.2$
12 сутки	$7.7 \pm 0.7$	$10.2 \pm 0.5$	$8.4 \pm 1.3$	$2.9 \pm 0.5$	$4.1 \pm 0.2$	$3.6 \pm 0.7$	$7.8 \pm 0.2$	$8.6 \pm 0.2$	$8.0 \pm 0.3$
19 сутки	$9.8 \pm 1.1$	$10.7 \pm 1.1$	$9.8 \pm 2.1$	$2.7 \pm 0.4$	$3.9 \pm 0.7$	$3.6 \pm 0.5$	$9.3 \pm 0.3$	$8.8 \pm 0.3$	$7.9 \pm 0.3$

Примечание. Полученные результаты представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки среднего арифметического ( $M \pm m$ ); 1 ( $n = 10$ ) – показатели контрольной группы, 2 ( $n = 10$ ) – показатели крыс, облученных в течение 4 дней наносекундным ИПМИ с пППМ  $140 \text{ Вт}/\text{см}^2$  и с частотой повторения импульсов 8 Гц; 3 ( $n = 10$ ) – показатели крыс, облученных в течение 4 дней наносекундным ИПМИ с пППМ  $1500 \text{ Вт}/\text{см}^2$  и с частотой повторения импульсов 8 Гц.



2000; Лушников и др., 2003), может служить способностью низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты (КВЧ) оказывать противовоспалительное действие, а также модифицировать иммунный статус организма, повышать его адаптационные возможности, улучшать микроциркуляцию в поврежденных тканях, тем самым активировать репаративную регенерацию. Не исключено, что аналогичной возможностью по отношению к ранозаживлению, в том числе травм термической природы, обладает воздействие наносекундным ИПМИ, использованное в настоящей работе.

Менее интенсивное воздействие оказывает более выраженное ранозаживляющее действие. Ранее работами Эди (Adey, 1993), было показано существование определенных “частотных энергетических окон”. В соответствии с этим наибольшее биологическое действие оказывает радиочастотное излучение с частотами повторения импульсов в пределах 6–16 Гц и вполне конкретной, оптимальной интенсивности. При больших или меньших интенсивностях эффект существенно снижается или полностью исчезает. По-видимому, пППМ 140 Вт/см<sup>2</sup>, которая применялась в данной работе при частоте повторения импульсов 8 Гц, могла быть наиболее близка к оптимальному режиму воздействия, поэтому наблюдаемый эффект был более выражен. В соответствии с моделью Эйди (Adey, 1993), биологическому действию электромагнитных излучений подвержены процессы, опосредованные ионами Ca<sup>2+</sup>. Подтверждением этому могут быть результаты (Pilla, 2008; Strauch, 2009) продемонстрировавшие, что воздействие электромагнитным излучением способно усиливать кальций-кальмодулиновое связывание в клетки. Это активирует NO-синтазу и способствует усилению продукции оксида азота, который обеспечивает расширение капилляров и, соответственно, усиление микроциркуляции крови (Князева и др., 2011). Ранее было показано, что воздействие ИПМИ на митохондрии печени мышей изменяет содержание активных форм кислорода (АФК) (Большаков и др., 2012). Поэтому нельзя исключать возможности того, что облучение ран ИПМИ, помимо АФК, может аналогично продуцировать NO (Стручков и др., 2015), что ускоряет процесс регенерации эпидермиса и способствует более выраженному проявлению отторжения струпа.

Полученные экспериментальные результаты по стимулирующему эффекту заживления ожоговых ран у крыс в результате воздействия наносекундным ИПМИ можно с высокой степенью экстраполировать на ожоги человека. Вполне вероятно, что термические раны различной природы у

людей не превышающие 10% всего кожного покрова можно будет восстанавливать в короткие сроки с положительным результатом. Более того, отторжение струпа в месте ожоговой раны предполагает восстановление кожи без посттравматических рубцов. Поэтому в результате необременительной серии процедур неинвазивного воздействия ИПМИ пациенты не будут подвергаться риску неблагоприятных последствий, поскольку ИПМИ низких интенсивностей не превышают гигиенических уровней безопасности воздействия на организм (СанПиН 2.2.4/2.1.8.055-96, 1996). Более того, с учетом возможности снижения болевых ощущений в месте раны (Pilla, 2008), метод может найти широкое применение в медицине.

\* \* \*

Ускорение заживления ожоговых ран посредством наносекундных микроволновых импульсов, наблюдавшееся в проведенной экспериментальной работе, может стать основой новой перспективной технологии в косметологической и терапевтической практике. Для успешного использования такого подхода потребуются специальные клинические исследования для уточнения параметров воздействующего фактора (пППМ, частота повторения импульсов, количество импульсов и сеансов повторного облучения), а также проработка технических требований, необходимых для производства физиотерапевтического оборудования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Автандилов Г.Г.* Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990. 384 с.
- Ажикова А.К., Журавлева Г.Ф.* Исследование гематологических показателей крыс в норме и в условиях термического воздействия // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 2. С. 284.
- Александрова А.В.* Заживление ожоговой раны при лечении синтетическим ингибитором матричных металлопротеиназ доксициклином // Вестн. Харьковского нац. мед. ун-та. 2014. С. 4.
- Алексеев А.А., Бобровников А.Э.* Современные технологии местного консервативного лечения пострадавших от ожогов // Анналы хирургии. 2012. № 2. С. 32–38.
- Алексеев А.А., Бобровников А.Э., Малютина Н.Б.* Экстренная и неотложная медицинская помощь после ожоговой травмы // Мед. алфавит. 2016. Т. 2. № 15(278). С. 6–12.
- Бессонов А.Е., Чемерис Н.К., Ганеев А.Б.* Репаративная регенерация тканей под воздействием электромагнитных волн миллиметрового, инфракрасного и части видимого диапазонов, генерируемых терапевтическим аппаратом “Минитаг” НИР НЦИМ



- “ЛИДО” // Физ.-хим. основы информ. медицины. ИБК РАН. Пушкино, 2000. С. 18.
- Большаков М.А., Жаркова Л.П., Иванов В.В., Керей А.В., Князева И.Р., Кутенков О.П., Ростов В.В.* Оценка активности ферментов антиоксидантной защиты митохондрий печени мышей после воздействия наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения // Вест. Томского государственного университета. Биология. 2012. № 3(19). С. 122–136.
- Ганеев А.Б., Чемерис Н.К.* Механизмы биологического действия электромагнитного излучения крайне высоких частот на уровне организма. // Биомед. радиоэлектроника. 2007. № 8–9. С. 30–46.
- Ганеев А.Б.* Механизмы противовоспалительного и противоопухолевого действия низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высоких частот // Миллиметровые волны в биологии и медицине. 2012. № 3. С. 3.
- Еремин Н.В., Мнихович М.В., Мигляс В.Г., Тернов М.М.* Морфология кожной раны под влиянием низкоинтенсивного гелий-неонового лазерного излучения // Клини. и эксперим. морфология. 2012. № 1. С. 38–43.
- Звягинцева Т.В., Миронченко С.И., Гринь И.В.* Ранозаживляющее действие мази метилурацила, содержащей наночастицы серебра, при термическом ожоге крыс // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2014. Т. 2. № 2. С. 27–30.
- Имашева А.К.* Особенности регенеративных процессов кожи при термических ожогах у животных // Науч. журн. “Успехи современного естествознания”. 2014. № 7. С. 27–29.
- Князева И.Р., Медведев М.А., Жаркова Л.П., Гостюхина А.А., Кутенков О.П., Ростов В.В., Большаков М.А.* Действие наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения на процессы регенерации // Бюллетень сибирской медицины. 2011. № 6. С. 109–113.
- Ковальчук В.И.* Состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса при термическом ожоге кожи в эксперименте и клинике // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2015. № 1. С. 73–78.
- Лушников К.В., Ганеев А.Б., Чемерис Н.К.* Влияние электромагнитного излучения крайне высоких частот на иммунную систему и системная регуляция гомеостаза. // Радиационная биология. Радиэкология. 2002. Т. 42. № 5. С. 533–545.
- Лушников К.В., Ганеев А.Б., Шумилинина Ю.В.* Снижение интенсивности клеточного иммунного ответа и неспецифического воспаления при действии электромагнитного излучения крайне высоких частот // Биофизика. 2003. Т. 38. № 5. С. 918–925.
- Мамонтова Е.В.* Влияние ALPHA-токоферола на степень перекисного гемолиза белых мышей в норме и при иммобилизационном стрессе // Современные проблемы науки и образования. 2006. № 3. С. 27–28.
- Мельникова В.И., Извольская М.С., Воронова С.Н., Шарипова М.М., Рукин Е.М., Захарова Л.А.* Репаративная регенерация тканей кожи крысы под действием излучения лампы полого катода с линейчатым спектром марганца и меди // Цитология. 2010. Т. 52. № 3. С. 204–210.
- Полутова Н.В., Чеснокова Н.П., Островский Н.В., Невважай Т.А.* О патогенетической взаимосвязи нарушений метаболического статуса, клеточного состава и реологических свойств крови при поверхностной термической травме, их диагностическое и прогностическое значение // Саратовский научно-медицинский журн. 2011. Т. 7. № 4. С. 795–800.
- Самеева Е.В., Пак И.В.* Современные подходы в лечении ожоговых ран // Вестник Кыргызско-Российского Славянского университета. 2017. Т. 17. № 10. С. 200–203.
- Стручков А.А., Перетягин С.П., Вазина И.Р.* Значение местного применения активных форм кислорода для стимуляции процессов репарации в ожоговой ране // Биорадикалы и антиоксиданты. 2015. Т. 2. № 2. С. 52–60.
- Шнякина Т.Н., Безина Н.М., Щербаков Н.П.* Гематологические и клинические исследования при лечении экспериментальной ожоговой раны у собак // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2017. № 4(150). С. 127–131.
- Adey W.R.* Biological effects of electromagnetic fields // J. Cell Biochem. 1993. V. 51. № 4. P. 410–416.
- Athanasίου A., Karkambounas S., Batistatou A.* The effect of pulsed electromagnetic fields on secondary skin wound healing: an experimental study // Bioelectromagnetics. 2007. V. 28. P. 362–368.
- Chen C.H., Panizzon M.S., Eylar L.T.* Genetic influences on cortical regionalization in the human brain // Neuron. 2011. V. 72. Issue 4. P. 537–544.
- Euro guide on the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. FELASA: 2007. 17 p.*
- Gilpin D.A.* Calculation of a new Meeh constant and experimental determination of burn size // Burns. 1996. V. 22. № 8. P. 607–611.
- Klimov A.I., Kovalchuk O.V., Rostov V.V.* Measurement of Parameters of X-Band High-Power Microwave Super-radiative Pulses // IEEE Transactions on Plasma Science. 2008. V. 36. № 6. P. 1–4.
- Pilla A.* Proposed electrochemical mechanism of EMF modulation of tissue repair // The bioelectromagnetic society 30th annual meeting abstract collection, San Diego, California. 2008. P. 147.
- Strauch B., Herman C., Dabb R. et al.* Evidence-based use of pulsed electromagnetic field therapy in clinical plastic surgery // Aesthet. Surg. J. 2009. № 29(2). P. 135–143.

## Stimulation of Burn Wound Healing in Rats by Nanosecond Repetitive Pulsed Microwave

A. A. Gostyukhina<sup>1,2,3,#</sup>, A. V. Samoylova<sup>1,3,4</sup>, M. A. Bolshakov<sup>1,3</sup>, V. M. Mochalova<sup>3</sup>, K. V. Zaitsev<sup>2</sup>,  
O. P. Kutenkov<sup>1</sup>, and V. V. Rostov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of High Current Electronics SB RAS, Akademicheskoy Ave., 2/3, Tomsk, 634055 Russia

<sup>2</sup> Federal Scientific and Clinical Center of Medical Rehabilitation and Balneology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, R. Luxembourg Str., 1, Tomsk, 634009 Russia

<sup>3</sup> National research Tomsk State University, Lenin Str., 36, Tomsk, 634050 Russia

<sup>4</sup> Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow tract, 2, Tomsk, 634050 Russia  
<sup>#</sup>e-mail: antariks-tomsk2015@yandex.ru

The effect of repetitive pulsed microwaves (RPM, 10 GHz, 100 ns pulse duration, 8 Hz pulse repetition rate, 140 and 1500 W/cm<sup>2</sup> peak power flux density (PFD)) on the regeneration of burn wounds in rats was investigated. After 4-fold local irradiation of wounds with 140 and 1500 W/cm<sup>2</sup> at a frequency of 8 Hz, wound healing in the control and irradiated groups did not differ significantly (from days 1 to 14). The acceleration of healing of irradiated burn wounds was detected from the 19th day. From the 12th day, a partial separation of the formed scab was observed. Epithelialization was observed from 24 to 28 days. The effectiveness of RPM with 140 W/cm<sup>2</sup> turned out to be higher in comparison with 1500 W/cm<sup>2</sup>.

*Keywords:* burn wound, nanosecond pulses, microwave radiation, rats

УДК 547.68;57.084.1

## ВРЕМЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ПОЛИАРЕНОВ В ОБРАЗЦАХ СЕЗОННО–ТАЛОГО СЛОЯ ТУНДРОВЫХ ТОРФЯНИКОВ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

© 2022 г. Е. В. Яковлева\*, @, Д. Н. Габов\*

\*Институт биологии Федерального исследовательского центра Коми научного центра  
Уральского отделения РАН, ул. Коммунистическая, 28, Сыктывкар, 167982 Россия

@E-mail: kaleeva@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 21.01.2021 г.

После доработки 16.02.2022 г.

Принята к публикации 09.03.2022 г.

Проведен модельный эксперимент по разложению органического вещества торфа сезонно-талого слоя тундрового торфяника побережья Баренцева моря. Полученные данные свидетельствуют о постоянном варьировании состава полициклических ароматических углеводов в течение эксперимента. Изменения содержания полициклических ароматических углеводов могут быть описаны синусоидальной кривой с несколькими максимумами и минимумами. Предположительно, наличие экстремумов содержания полициклических ароматических углеводов и перекомбинации их состава в ходе эксперимента объясняется тем, что в отсутствие легкодоступных для разложения легких углеводов микроорганизмы начинали разлагать более тяжелые структуры, а при снижении их содержания – высокомолекулярные органические вещества торфа.

**Ключевые слова:** модельный эксперимент, торфяники, органическое вещество, полициклические ароматические углеводороды, разложение

**DOI:** 10.31857/S1026347022050213

Химический состав торфа является результатом комбинации химического состава тканей болотных растений и микроорганизмов, почвенных вод и вторичных веществ, образующихся при его разложении (Bozkurt *et al.*, 2001). В значительных количествах в составе торфа присутствуют полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) – органические соединения бензольного ряда, которые могут иметь как природное, так и антропогенное происхождение. Они являются суперэкоксикантами (Brien *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2017; Cheng *et al.*, 2019; Yakovleva, Gabov, 2019), с одной стороны, и необходимыми органическими компонентами для растений с другой.

Высокая химическая устойчивость ПАУ в сочетании с кислой и анаэробной средой торфяной залежи препятствует их деградации. Низкая водорастворимость полиаренов также увеличивает их сорбцию почвенными частицами и ограничивает доступность для микробиологического разложения (Пастухов и др., 2017). Показано, что с увеличением длительности пребывания ПАУ в почвах их экстракционная способность, разлагаемость и токсичность уменьшаются (Wilcke, 2000; Thuens *et al.*, 2013). Модельный эксперимент по разложению 10 ПАУ в аэробных и анаэробных условиях

торфе показал, что их содержание в течение 3 лет не изменялось от исходного уровня (Thuens *et al.*, 2013).

ПАУ могут образовываться из более сложных высокомолекулярных органических соединений, присутствовавших в торфе: лигнина, пентациклических терпенов, структур с диеновыми или полиеновыми связями в алифатических углеводородных цепях, липидов (Орлов, 1990; Wilcke, 2000; Яковлева и др. 2008, 2015).

Исследование шестнадцати гуминовых кислот и одной фракции гумина, выделенных из торфяной почвы на содержание ПАУ показали, что гумин является основным поглотителем ПАУ в почве, благодаря высоко-конденсированной физической структуре и большому количеству алифатических углеродных цепей. Авторы связывают с этим фактом устойчивость и слабую биоразлагаемость ПАУ в торфяниках (Chen *et al.*, 2017). Более прочные связи между ПАУ и гумином, по сравнению с гуминовыми и фульвокислотами, выявили и другие исследователи. Показано, что связи между гуминами и ПАУ были более прочными для низкомолекулярных 2–3 ядерных ПАУ, чем для высокомолекулярных 4–6 ядерных полиаренов. Это обусловлено более высокой подвиж-

ностью и более легкой диффузией легких ПАУ в стабильные фракции почвенного органического вещества, по сравнению с тяжелыми ПАУ (Ukalska-Jaruga *et al.*, 2019).

Модельный эксперимент по разложению сфагновой подстилки в течение 120 дней позволил установить, что легкие ПАУ могут быть поглощены растворимыми углеводами в сфагновом помете, тогда как тяжелые полиарены были связаны с другими фракциями органического вещества. Выявлены значимые положительные корреляции между легкими ПАУ и общим органическим углеродом (ТОС). Что свидетельствует о том, что при разложении растворимого органического вещества, высвободившиеся ПАУ легко подвергались микробиологическому разложению. Отрицательная корреляция между содержанием фульвокислот и концентрацией ПАУ, по мнению авторов, может объясняться влиянием фульвокислот на деградацию ПАУ за счет увеличения их биодоступности (Wang *et al.*, 2018).

Другие исследования показали влияние уровня влажности на степень разложения гуминовых кислот и гумина антарктических почв. Как показано соотношением алкил С/О-алкил С (при использовании данного соотношения), степень разложения данных веществ была выше при высоком уровне влажности (Carvalho *et al.*, 2013). Сходные данные были получены в 180-дневном лабораторном инкубационном эксперименте по разложению гуминовых веществ при разных уровнях влажности (Li *et al.*, 2016). Также авторами установлено, что гуминовые кислоты антарктических почв менее устойчивы к разложению по сравнению с почвами других регионов (Carvalho *et al.*, 2010). Влажность образцов в эксперименте была довольно высока и составляла  $88.4 \pm 0.9\%$ . Торф сформирован в холодных условиях Арктики, и, вероятно, гуминовые кислоты, также были хорошо подвержены разложению. Данные факторы были благоприятным для разложения органических веществ, ведущего к новообразованию ПАУ в торфе. Так как гуминовые кислоты арктических регионов менее устойчивы к деградации, а повышенная влажность торфа выступала как дополнительный фактор их более интенсивного разложения.

На основании корреляционного и дисперсионного анализов была показана достоверная взаимосвязь между степенью ароматичности фульво- и гуминовых кислот и содержанием тяжелых полиаренов в разных слоях торфа (Габов и др., 2017).

Одним из источников образования ПАУ в торфе может быть разрушение лигнина. В природе наиболее эффективную биодеградацию лигнина осуществляют базидиомицеты, принадлежащие к группе грибов белой гнили, такие как *Ceriporiopsis subverispora* (Pilát) Gilb. & Ryvarden, *Phlebia* spp., *Physisporinus rivulosus* (Berk. & M.A. Curtis) и *Di-*

*chomitus squalens* (P. Karst.) D.A. Reid. (Феофилова и др., 2016). Грибы белой гнили осуществляют полный распад лигнина благодаря способности расколоть С $\alpha$ -С $\beta$ ,  $\beta$ -арил, С1-С $\alpha$  связи, включая ароматические (Janusza *et al.*, 2013). Из-за уникальной способности неспецифических окислительных ферментов вступать в реакцию с различными ароматическими субстратами, грибы белой гнили являются наиболее эффективными деструкторами гумусовых соединений. Известно, что из-за крупного размера макромолекулы гумусовых веществ не могут проникать внутрь клеток микроорганизмов, поэтому процесс их биоразложения протекает под действием внеклеточных ферментов (Huang *et al.*, 2013; Дину, Губернаторова, 2013). Установлено, что грибы белой гнили способны разлагать и ПАУ (Koschorreck *et al.*, 2008; Никифорова и др., 2010; Cao *et al.*, 2020). Грибы, как и микроорганизмы, разлагают полиарены посредством последовательного гидроксирования ароматических колец (Елин, 2001; Byss *et al.*, 2008). В результате последовательного разложения ПАУ могут разрушиться до соединений бензола, а затем и до простых веществ углерода и водорода (рис. 1).

Грибы являются основой микробиологических сообществ северных территорий (Хабибуллина и др., 2012; Власов и др., 2014, 2018). Канадскими учеными, на основании модельного эксперимента по влиянию потепления на микробиоту бореальных торфяников, показано, что изменения в функциональных группах грибов зависели от температуры (Asemaninejada *et al.*, 2018). Так, грибы потенциально способные разлагать целлюлозу доминировали при +4°C, тогда как при температуре +8°C преобладали потенциально разлагающие лигноцеллюлозу грибы. Авторы утверждают, что в процессе потепления происходит сдвиг в составе грибкового сообщества в пользу разлагателей более устойчивых соединений углерода (таких как лигнин).

Эксперимент по потеплению в бореальном лесу Аляски и изучению изменения распространенности грибковых таксонов подтвердил, что, в целом, вызванные потеплением сдвиги в грибковых сообществах могут сопровождаться их повышенной способностью разрушать лигнин (Treseder *et al.*, 2016). Другими авторами получены данные о том, что повышение температуры инкубации привело к повышению уровня минерализуемого углерода в антарктических почвах (Carvalho, 2010, 2013).

В современных условиях глобальных климатических изменений приводящих к потеплению в северных регионах, особый интерес приобретает изучение влияния процессов потепления на органическое вещество, законсервированное в тундровых торфяниках.

Целью данной работы было оценить временные изменения содержания полиаренов в образ-

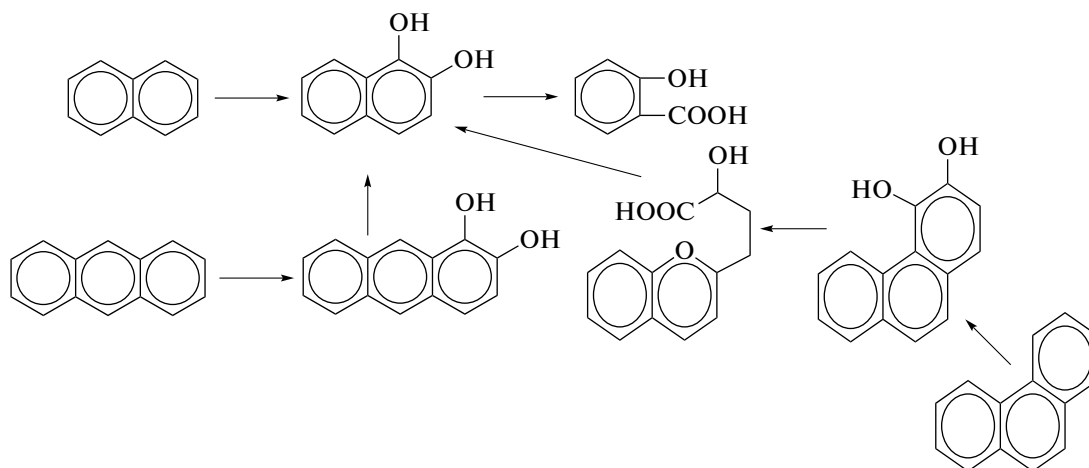


Рис. 1. Окисление полиаренов по Е.С. Елину, 2001.

цах сезонно-талого слоя тундровых торфяников в условиях модельного эксперимента с повышением температуры, моделирующим естественное потепление.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экперимент по разложению органических веществ сезонно-талого слоя тундровых торфяников был проведен на образце торфа сезонно-талого слоя, отобранного в августе 2018 г. на побережье Баренцева моря. Образец был заморожен, а 30 апреля 2019 г. была произведена разморозка образца в стерильных условиях. 1 мая 2019 г. образец был тщательно перемешан и размещен в стерильные виалы из темного стекла объемом 30 см<sup>3</sup>. Образец набивался в виалы и тщательно утрамбовывался, чтобы ограничить поступление воздуха. С целью соблюдения стерильности эксперимента и предотвращения попадания привнесенной микробиоты из воздуха виалы тщательно закупоривали. Для этого использовали заворачивающиеся крышки, которыми закрывали виалы, наглухо обматывали восковой лентой. Закладку эксперимента проводили в стерильных условиях, чтобы избежать попадания микроорганизмов извне. Виалы помещали в холодную комнату с температурой  $5 \pm 1^\circ\text{C}$  без попадания света. Данные условия, по нашему мнению, соответствовали естественным условиям разморозки торфа при возможном потеплении климата. Каждый месяц 3 пробы эксперимента доставали из холодной комнаты, высушивали в течение 2 дней при комнатной температуре, измельчали и проводили химический анализ на содержание 16 ПАУ. На первом этапе также были отобраны и проанализированы 3 пробы торфа. Эксперимент проводили в течение года с мая 2019 по май 2020 г. Всего было проанализировано 39 проб торфа.

Химико-аналитические исследования торфа выполняли в ЦКП “Хроматография” Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН. Для извлечения ПАУ из почв и растений использовали систему ускоренной экстракции растворителями ASE-350 (“Dionex Corporation”, США). Пробу торфа массой 1 г помещали в экстракционную ячейку и трижды экстрагировали смесью хлористый метилен : ацетон (1 : 1) при температуре 100°C. Затем экстракты концентрировали с применением аппарата Кудерна–Даниша при температуре в термостате 70°C и заменяли растворитель на гексан. Полученный концентрат пробы объемом 3 см<sup>3</sup> очищали от неорганических примесей методом колоночной хроматографии с использованием оксида алюминия II степени активности по Брокману. В качестве элюэнта использовали 50 см<sup>3</sup> смеси гексан : хлористый метилен (4 : 1). Элюат концентрировали с применением аппарата Кудерна–Даниша при температуре в термостате 85°C до объема 5 см<sup>3</sup>, затем добавляли 3 см<sup>3</sup> ацетонитрила и упаривали при температуре 90°C до полного удаления гексана. Концентрат пробы в ацетонитриле анализировали на содержание ПАУ методом ВЭЖХ (Yakovleva, Gabov, 2019). Контроль точности результатов измерений проводили с использованием стандартного Standard Reference Material 1944 “New York/New Jersey Waterway Sediment” (National Institute of Standards & Technology, USA) для почв. Статистическая обработка результатов проведена с использованием программного пакета Statistica 6.1. Данные были обработаны в трехкратной повторности для каждой стадии эксперимента. Рассчитано среднее значение и его стандартное отклонение. Статистическую обработку для оценки достоверности расхождений средних данных проводили при помощи *t*-критерия Стьюдента,  $P = 0.95$ .

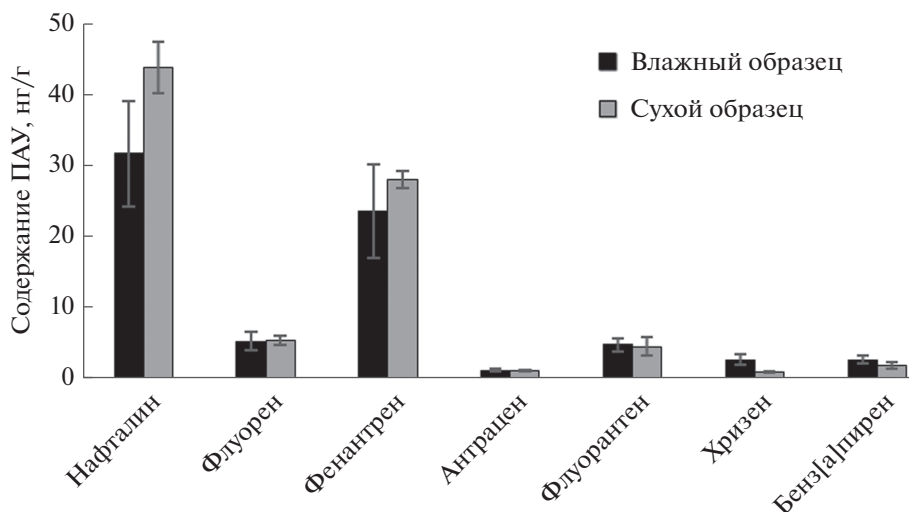


Рис. 2. Содержание ПАУ в сухом и влажном образце в начале эксперимента, нг/г.

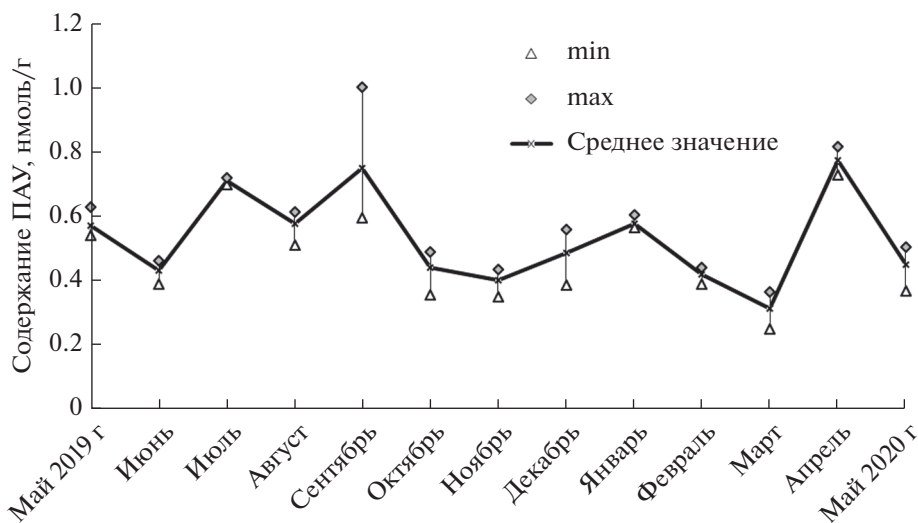


Рис. 3. Суммарное содержание ПАУ в течение эксперимента, нмоль/г.

**Подбор условий проведения эксперимента.** На первом этапе была определена возможность использования для анализа торфа сухих и влажных образцов (рис. 2). Данные по влажным образцам даны в пересчете на сухой вес. Результаты опыта показали, что, в целом, в сухих и влажных образцах обнаруживаются одни и те же структуры полиаренов, отклонения входят в пределы рассчитанной погрешности полученных значений. Использование влажных образцов приводит к занижению результатов содержания в пробе нафталина и фенантрена. Мы связываем этот факт с тем, что наличие воды в пробе приводит к снижению эффективности экстракции органических веществ, за счет эффекта обволакивания. Влажные пробы характеризуются большей вариативностью результатов

по сравнению с сухими. Данный момент связан с неравномерностью распределения жидкости в пробе, что также искажает результаты анализа. В связи с полученными результатами, для получения данных в ходе эксперимента мы использовали сухие образцы торфа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Следует отметить, что в процессе эксперимента мы наблюдали постоянные изменения в содержании ПАУ, которые могут быть описаны синусоидальной кривой с несколькими максимумами и минимумами (рис. 3).

Достоверность расхождений суммарного количества ПАУ ходе эксперимента представлена в

Таблица 1. Статистический анализ, *t*-критерий Стьюдента

F-ratio	Май 2019	Июнь	Июль	Август	Сентябрь	Октябрь	Ноябрь	Декабрь	Январь	Февраль	Март	Апрель	Май 2020
Май 2019	1.0	<b>1.8</b>	<b>19.5</b>	1.3	18.7	2.1	<b>1.3</b>	3.2	5.3	<b>3.8</b>	<b>1.3</b>	<b>1.3</b>	1.8
Июнь	<b>1.8</b>	1.0	<b>10.8</b>	<b>2.3</b>	33.8	3.8	1.4	5.7	<b>2.9</b>	2.1	<b>2.4</b>	<b>1.4</b>	3.3
Июль	<b>19.5</b>	<b>10.8</b>	1.0	<b>25.3</b>	365.0	<b>41.4</b>	<b>15.4</b>	<b>61.6</b>	<b>3.7</b>	<b>5.2</b>	<b>26.0</b>	14.8	<b>36.0</b>
Август	1.3	<b>2.3</b>	<b>25.3</b>	1.0	14.4	1.6	<b>1.6</b>	2.4	6.8	<b>4.9</b>	1.0	<b>1.7</b>	1.4
Сентябрь	18.7	33.8	365.0	14.4	1.0	8.8	23.7	5.9	98.4	70.6	<b>14.1</b>	24.7	10.2
Октябрь	2.1	3.8	<b>41.4</b>	1.6	8.8	1.0	2.7	1.5	<b>11.2</b>	8.0	1.6	<b>2.8</b>	1.2
Ноябрь	<b>1.3</b>	1.4	<b>15.4</b>	<b>1.6</b>	23.7	2.7	1.0	4.0	<b>4.2</b>	3.0	1.7	1.0	2.3
Декабрь	3.2	5.7	<b>61.6</b>	2.4	5.9	1.5	4.0	1.0	16.6	11.9	<b>2.4</b>	<b>4.2</b>	1.7
Январь	5.3	<b>2.9</b>	<b>3.7</b>	6.8	98.4	<b>11.2</b>	<b>4.2</b>	16.6	1.0	<b>1.4</b>	<b>7.0</b>	<b>4.0</b>	<b>9.7</b>
Февраль	<b>3.8</b>	2.1	<b>5.2</b>	<b>4.9</b>	70.6	8.0	3.0	11.9	<b>1.4</b>	1.0	<b>5.0</b>	<b>2.9</b>	7.0
Март	<b>1.3</b>	<b>2.4</b>	<b>26.0</b>	1.0	<b>14.1</b>	1.6	1.7	<b>2.4</b>	<b>7.0</b>	<b>5.0</b>	1.0	<b>1.8</b>	1.4
Апрель	<b>1.3</b>	<b>1.4</b>	14.8	<b>1.7</b>	24.7	<b>2.8</b>	1.0	<b>4.2</b>	<b>4.0</b>	<b>2.9</b>	<b>1.8</b>	1.0	<b>2.4</b>
Май 2020	1.8	3.3	<b>36.0</b>	1.4	10.2	1.2	2.3	1.7	<b>9.7</b>	7.0	1.4	<b>2.4</b>	1.0

Примечание. Значимые отклонения выделены жирным шрифтом.

табл. 1. Парно анализировались различия в суммарном содержании ПАУ между разными месяцами, на основании этого оценивалась достоверность прироста или убыли суммы ПАУ в данном месяце по сравнению с предыдущим и, при необходимости, с другими месяцами.

В течение месяца происходили изменения в составе ПАУ, содержание полиаренов статистически значимо понизилось в июне от исходного уровня. Еще через месяц в июле мы наблюдали статистически значимое повышение содержания суммарного содержания полиаренов, по сравнению как с июнем, так и с исходным уровнем. В августе выявлено очередное снижение содержания ПАУ, статистически значимое относительно июля и статистически не значимое по сравнению с исходным уровнем. Дальнейшие колебания количества ПАУ в сентябре также присутствовали, но были статистически не значимы. В ноябре происходило статистически значимое снижение содержания полиаренов в пробах модельного эксперимента по сравнению с исходным уровнем, июлем и августом. Затем происходило плавное повышение количества ПАУ, которое было статистически значимо только в январе. С февраля вновь наблюдали статистически значимое снижение содержания ПАУ с минимумом в марте. В апреле выявлен резкий статистически значимый рост количества ПАУ. В мае 2020 г. содержание ПАУ начинало статистически значимо снижаться.

Аналогично изменениям общего содержания полиаренов, изменялась количество нафталина (табл. 2). Вероятно, это связано с тем, что доля

нафталина от суммарного содержания ПАУ в торфе составляла 46–74% на разных этапах проведения эксперимента. Количество флуорена, фенантрена, флуорантена и антрацена изменялась сходным образом, но был выявлен дополнительный максимум его накопления в ноябре, когда для общего содержания ПАУ и нафталина выявлен минимум. Для хризена получены сходные данные с фенантrenom, но с ноября до конца эксперимента его содержание почти не изменялось, в мае 2020 г. хризен не был обнаружен в торфе. Пирен в начале эксперимента в торфе отсутствовал и появлялся в только в октябре, в ноябре отмечен минимум его накопления, а далее планомерный рост. Сходные закономерности выявлены и для тяжелых ПАУ. Суммарная доля тяжелых полиаренов в начале эксперимента составляла 1.5%, но закономерно возрастала со временем, к концу эксперимента достигая 11.5%.

Это обеспечивалось приростом содержания разных индивидуальных структур: в октябре наблюдали количественный максимум бенз[k]флуорантена, в декабре бенз[a]пирена и бенз[ghi]перилена, в январе бенз[b]флуорантена, в феврале и апреле бенз[k]флуорантена и дибенз[a,h]антрацена, в мае 2020 года бенз[b]флуорантена и бенз[a]пирена. Такой факт может быть связан с тем, что разные структуры ПАУ могут быть связаны с разными фракциями органического вещества (Wang *et al.*, 2018).



Таблица 2. Содержание индивидуальных ПАУ в течение эксперимента, нмоль/г

ПАУ	Май 2019		Июнь		Июль		Август		Сентябрь		Октябрь		Ноябрь		Декабрь		Январь		Февраль		Март		Апрель		Май 2020		
	$\bar{X}$	$S\bar{X}$	$\bar{X}$	$S\bar{X}$	$\bar{X}$	$S\bar{X}$	$\bar{X}$	$S\bar{X}$	$\bar{X}$	$S\bar{X}$	$\bar{X}$	$S\bar{X}$	$\bar{X}$	$S\bar{X}$	$\bar{X}$	$S\bar{X}$	$\bar{X}$	$S\bar{X}$	$\bar{X}$	$S\bar{X}$	$\bar{X}$	$S\bar{X}$	$\bar{X}$	$S\bar{X}$	$\bar{X}$	$S\bar{X}$	$\bar{X}$
Нафталин	0.343	0.028	0.322	0.027	0.426	0.036	0.417	0.036	0.505	0.090	0.296	0.034	0.184	0.013	0.308	0.042	0.345	0.031	0.227	0.021	0.154	0.056	0.434	0.029	0.198	0.025	
Флуорен	0.032	0.004	0.017	0.003	0.063	0.006	0.023	0.005	0.048	0.010	0.014	0.003	0.020	0.002	0.016	0.002	0.017	0.001	0.018	0.002	0.009	0.002	0.031	0.002	0.023	0.002	
Фенантрен	0.158	0.007	0.057	0.003	0.127	0.005	0.099	0.009	0.144	0.043	0.080	0.007	0.131	0.013	0.085	0.008	0.123	0.015	0.092	0.016	0.086	0.009	0.202	0.014	0.137	0.014	
Антрацен	0.006	0.001	0.000	0.000	0.004	0.001	0.006	0.004	0.008	0.004	0.003	0.000	0.007	0.001	0.004	0.001	0.005	0.001	0.006	0.001	0.002	0.000	0.010	0.001	0.005	0.002	
Флуорантен	0.022	0.007	0.022	0.002	0.022	0.002	0.014	0.008	0.019	0.007	0.014	0.004	0.027	0.004	0.020	0.002	0.024	0.006	0.018	0.004	0.013	0.004	0.025	0.000	0.030	0.006	
Пирен	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.024	0.003	0.012	0.002	0.011	0.001	0.014	0.003	0.012	0.005	
Бенз[а]антрацен	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.003	0.002	0.001	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.002	
Хризен	0.004	0.000	0.007	0.003	0.029	0.033	0.006	0.007	0.007	0.001	0.002	0.001	0.006	0.000	0.003	0.000	0.004	0.000	0.004	0.001	0.002	0.001	0.003	0.001	0.000	0.000	
Бенз[б]флуорантен	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006	0.002	
Бенз[к]флуорантен	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.003	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.002	0.001	0.002	0.000	0.005	0.001	0.002	0.001	
Бенз[а]пирен	0.007	0.002	0.007	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.003	0.003	0.000	0.002	0.002	0.010	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.001	
Дибенз[а,h]антрацен	0.000	0.000	0.000	0.000	0.024	0.002	0.010	0.009	0.016	0.001	0.022	0.010	0.018	0.008	0.004	0.000	0.028	0.004	0.041	0.001	0.034	0.005	0.050	0.008	0.029	0.015	
Бенз[ghi]перилен	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
Сумма ПАУ	0.571	0.036	0.432	0.027	0.709	0.008	0.576	0.041	0.750	0.155	0.442	0.403	0.403	0.032	0.485	0.663	0.578	0.016	0.420	0.018	0.313	0.041	0.773	0.031	0.450	0.048	

Примечание.  $\bar{X}$  – среднее значение,  $S\bar{X}$  – стандартное отклонение.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В мае на начальной стадии эксперимента в торфе обнаружено 7 структур ПАУ: нафталин, флуорен, фенантрен, антрацен, флуорантен, хризен и бенз[а]пирен. Другими авторами показано, что аценафтен, флуорен, пирен, дибенз [a, h] антрацен, нафталин и бенз [ghi] перилен имеют в основном биопедогенное происхождение и образуются в восстановительных условиях в заболоченных горизонтах почв (Atanassova, Brummer, 2004). Статистически значимое снижение суммарного количества через месяц могло быть связано с активизацией микробиоты торфа в условиях повышения температуры до  $+5 \pm 1^\circ\text{C}$ , которая приводила к разрушению полиаренов торфа флуорена, фенантрена до нафталина, при этом избыточные количества нафталина, вероятно, также разлагались до неорганических соединений (Елин, 2001; Byss *et al.*, 2008; O'Brien *et al.*, 2013), что вело к снижению его содержания и общему значимому снижению количества ПАУ в торфе. Также в торфе отмечено снижение содержания бенз[а]пирена, который, по-видимому, разрушался до хризена, молярная доля которого увеличилась.

Китайскими исследователями также была показана обратная зависимость содержания 2–3 ядерных и 5–6 ядерных ПАУ в эксперименте по разложению сфагновой подстилки. Это свидетельствовало о возможности разрушения тяжелых полиаренов до более легких структур (Wang *et al.*, 2018). Возможность образования 2, 3, 4-ядерных ПАУ из 5-ядерного бенз[а]пирена продемонстрировано и другими исследованиями, проведенными на основании 2-летнего эксперимента по разрушению бенз[а]пирена (Minkina *et al.*, 2020).

В июле мы наблюдали статистически значимое повышение количества ПАУ, связанное с 2–4 кратным возрастанием содержания флуорена, фенантрена и хризена и появлением новообразованных тяжелых структур дибенз[a,h]антрацена и бенз[ghi]перилена, которые могли образоваться из высокомолекулярных органических молекул лигнина, терпенов, гуминовых кислот в процессе микробиологического разложения. Тяжелые структуры под действием микробиоты могли частично разрушаться, что и приводило к выше описанному дополнительному приросту легких ПАУ. С полным разложением может быть связано отсутствие бенз[а]пирена в торфе на данном этапе эксперимента.

На основании модельного эксперимента по разложению органических веществ тропических торфяных почв, показано, что изменения ферментативной кинетики определяют оптимальную стратегию кормодобывания, которая указывает на то, что микроорганизмы будут максимизиро-

вать свои усилия по добыванию пищи в направлении получения ограничивающих питательных веществ, уравнивая распределение ресурсов для неограничивающих питательных веществ (Sih *et al.*, 2019).

В нашем случае, в отсутствии легкодоступных для разложения легких ароматических углеводов микроорганизмы начинали разлагать более тяжелые структуры ПАУ, а при снижении их содержания высокомолекулярные органические вещества торфа.

К данному предположению склоняются и другие авторы, показывая, что незначительная скорость разложения тяжелых ПАУ в течение 0–30 дней модельного эксперимента, возможно, была связана с первоначальным потреблением микробиоты из других источников углерода, таких, например, как более легкие фракции общих нефтяных углеводородов (Vasconcelos *et al.*, 2011). Некоторая цикличность изменения содержания ПАУ также была показана, в модельном эксперименте по разложению сфагновой подстилки. В первые 40 дней эксперимента разложению подвергались преимущественно легкие структуры ПАУ, с 60 по 120 день стало снижаться содержание тяжелых структур (Wang *et al.*, 2018).

Дальнейшее статистически значимое снижение количества ПАУ в августе сопровождалось 2–5 кратным снижением содержания, флуорена, хризена и дибенз[a,h]антрацена в меньшей степени других ПАУ. Бенз[ghi]перилен был полностью подвергнут микробиологическому разложению. Незначительный рост содержания наблюдали лишь для антрацена. На данном этапе деятельности микробиоты, по-видимому, была направлена на использование имеющихся полиаренов, высокомолекулярные органические вещества торфа слабо подвергались разложению. Было выявлено образование в торфе незначительных количеств бенз[k]флуорантена.

Следующий этап сентября был связан с незначительным и статистически не значимым приростом всех полиаренов за исключением бенз[k]флуорантена, количество которого немного снижалась. В целом, это приводило к незначимому повышению суммарного содержания ПАУ. 1.5 кратный прирост дибенз[a,h]антрацена и появление в торфе бенз[а]пирена говорило о новом этапе разрушения высокомолекулярных органических веществ торфа. Предполагается, что лигнин является основным источником органического вещества почвы, особенно конденсированных ароматических молекул (DiDonato, 2016). О повышении активности лигнина разлагающей микробиоты при повышении температуры выше  $+4^\circ\text{C}$  упоминают и другие авторы (Treseder *et al.*, 2016; Asemaninejada *et al.*, 2018). По данным Головацкой и Никоновой (2013) скорость разложения торфообразующих

растений в течение года колеблется от 3% для мхов до 72% для травянистых растений. В нашем исследовании интенсивное разложение растительных остатков торфа может быть причиной деструкции лигнина с последующим образованием высокомолекулярных структур ПАУ. Волокнистые грибы, такие как базидиомицеты белой гнили, могут разлагать почвенные биополимеры подобные лигнину и гумусовым соединениям (Grinhut *et al.*, 2007; Janusza *et al.*, 2013; Дину, Губернаторова, 2013). В деструкцию лигнина вовлекается ряд внеклеточных ферментов, действие которых ведет к образованию неустойчивых соединений (например, фенокси- и карбокси-радикалов), которые затем подвергаются конденсации или полимеризации, что является процессом гумификации (Дину, Губернаторова, 2013). При этом лигнинолитические ферменты грибов, такие как лакказы, лигниновая пероксидаза и Mn-зависимая пероксидаза способны разрушать и ПАУ (Hamdi *et al.*, 2007). Деградация ПАУ в почве грибами белой гнили была ранее продемонстрирована многими исследователями (Canet *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2003; Novotny *et al.*, 2004; Никифорова и др., 2010; Cao *et al.*, 2020)

В октябре мы наблюдали статистически незначимое снижение как суммарного количества ПАУ, так и содержания всех индивидуальных структур, за исключением дибенз[a,h]антрацена, содержание которого возрастало в 1.3 раза. Таким образом, как и в случае августа, нами было выявлено переключение микробной биомассы на преимущественное разложение более простых компонентов почвенного органического вещества.

Тренд снижения количества ПАУ продолжился и в ноябре. Снижение было статистически незначимым. Данный факт был обусловлен тем, что в процессе активного микробиологического разложения уменьшалась лишь количество нафталина, разлагавшегося до неорганики, бенз[a]пирена и дибенз[a,h]антрацена, при преобразовании которых синтезировались более легкие 3–4 ядерные структуры, содержание которых, наоборот, возрастало. Исследования, показали, что в процессе деструкции лигнина возможна дальнейшая деградация органических веществ с последующей минерализацией (Grinhut *et al.*, 2007; O'Brien *et al.*, 2013; Дину, Губернаторова, 2013).

В декабре мы наблюдали статистически незначимый рост количества ПАУ за счет нафталина и бенз[a]пирена. Нафталин, по-видимому, образовывался из 3–4 ядерных структур ПАУ, доля которых в торфе снижалась. Источником бенз[a]пирена, количество которого возросло в 6 раз, могли быть процессы разложения высокомолекулярных органических веществ торфа, на разрушение которых была направлена деятельность микробиоты.

Статистически незначимый рост количества ПАУ в торфе продолжался и в январе. При этом происходило разрушение бенз[a]пирена, его содержание снижалось в 8 раз, при этом доля легких структур незначительно возрастала. Отмечался резкий прирост дибенз[a,h]антрацена в 6 раз. Одновременно шли процессы разрушения микроорганизмами тяжелых структур ПАУ и более высокомолекулярных веществ.

В феврале суммарное количество ПАУ статистически значимо снижалось, что было обусловлено снижением количества легких структур: нафталина, фенантрена, флуорантена, пирена. При этом незначительно возрастало содержание бенз[k]флуорантена, продолжался рост содержания дибенз[a,h]антрацена. Микроорганизмы, при недостатке низкомолекулярных структур, начинали разрушать высокомолекулярную органику. Ранее нами (Yakovleva *et al.*, 2020) и другими исследователями (Berset *et al.*, 2001) в природных условиях была показана обратная зависимость в накоплении легких и тяжелых структур ПАУ. Пик накопления бенз[ghi]перилена в слоях торфа был принят индикатором активного разложения лигнина остатков травянистых растений. Пик повышения массовой доли нафталина свидетельствовал о том, что в данном горизонте идут процессы расщепления тяжелых ПАУ до более легких структур.

В марте отмечено снижение количества всех ПАУ, что приводило к статистически значимому снижению их суммарного содержания до значений октября и ноября. В данном месяце было выявлено минимальное содержание ПАУ в торфе. Микроорганизмы активно разрушали синтезированные полиарены.

После минимума наблюдаемого в марте, в апреле проявлялся пиковый рост количества всех полиаренов. Прирост был статистически значим. Суммарное содержание ПАУ возрастало в 2.5 раз по сравнению со значениями марта. Основной прирост происходит за счет 2–3 ядерных структур: нафталина, фенантрена, флуорена, антрацена. Идет активное вовлечение почвенной органики в процессы функционирования микробиоты сопровождающееся новообразованием ПАУ, деятельность микроорганизмов направлена на разрушение высокомолекулярных органических соединений и тяжелых структур ПАУ.

На конечной стадии эксперимента в мае 2020 г. выявлено статистически значимое снижение содержания ПАУ до значений ноября. Образованные в апреле нафталин, фенантрен, флуорен, антрацен разлагаются, по-видимому, до бензольных или простых соединений. Тяжелые полиарены бенз[k]флуорантен и дибенз[a,h]антрацен, количество которых также убывало, могли разлагаться с образованием флуорантена, прирост которого мы

наблюдали в данный период. При этом появляются бенз[b]флуорантен и бенз[a]пирен, не обнаруженные в торфе с января, что свидетельствует о включении очередного цикла микробного разложения высокомолекулярной органики (гуминовых кислот, терпенов, лигнина, почвенных липидов и др.)

Значения содержания ПАУ в конце эксперимента (май 2020) близки к начальным значениям (май 2019), отклонения статистически не значимы. При этом происходит перекомбинация качественного состава ПАУ, выраженная в снижении содержания легких структур ПАУ и повышение количества высокомолекулярных ПАУ в конце эксперимента. Данный факт подтверждает необходимость ежемесячного контроля содержания ПАУ в эксперименте, который позволил отследить статистически значимые изменения происходящие в составе ПАУ торфа, в том числе связанные с процессами разложения высокомолекулярной органики. Эксперименты с измерением содержания ПАУ раз в полгода не позволили выявить значимых изменений в составе ПАУ (Thuens *et al.*, 2013). По-видимому, определенный баланс ПАУ, как необходимых питательных веществ для организмов, постоянно поддерживается в системе.

Таким образом, в ходе эксперимента мы наблюдали циклические изменения содержания ПАУ, обусловленные переключением почвенной микробиоты с активного разложения полиаренов на разрушение высокомолекулярных соединений почвы: молекул лигнина, терпенов, гуминовых кислот и т.д. Следует отметить, что синусоидальная кривая растягивалась в течение эксперимента. Если в начале эксперимента количественные минимумы и максимумы ПАУ сменяли друг друга ежемесячно, то к концу эксперимента для таких изменений требовалось уже два месяца. Возможно, такой эффект связан со стабилизацией микробного сообщества, которое на начальных этапах эксперимента, в связи с размораживанием, находилось в экстремальных условиях.

\* \* \*

Исследование временных изменений ПАУ в условиях модельного эксперимента по разрушению торфа сезонно-талого слоя позволило выявить циклические изменения в составе полиаренов, описываемые синусоидальной кривой с несколькими максимумами и минимумами. Мы предполагаем, что подобные изменения могли быть связаны с изменениями кормовой стратегии почвенной микробиоты, которая использовала в качестве источника энергии сначала низкомолекулярную органику в виде ПАУ, а при снижении их содержания в торфе активизировала ферменты, направленные на разрушение высокомолекулярных органических веществ лигнина, гумино-

вых кислот и т.д. Для подтверждения данной гипотезы необходимо проведение исследования ферментативной активности, которое является целью наших дальнейших исследований.

Выявленный эффект растягивания синусоидальной кривой к концу эксперимента, вероятно, связан со стабилизацией микробного сообщества, которое на начальных этапах эксперимента, в связи с размораживанием, находилось в экстремальных условиях.

Выход на исходные значения суммарного количества ПАУ к концу эксперимента, при наличии значимых экстремумов в течении года, свидетельствовал об существовании определенного баланса ПАУ в системе торфяного образца. Полученные данные подтвердили необходимость ежемесячного отслеживания изменений содержания ПАУ в подобных модельных экспериментах.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке госбюджетной темы ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН № ЕГИСУ 122040600023-8.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Власов Д.Ю., Абакумов Е.В., Томашунас В.М., Крыленков В.А., Зеленская М.С. Микобиота почв и антропогенных субстратов полуострова Ямал // Гигиена и санитария. 2014. Т. 93. № 5. С. 49–51.
- Власов Д.Ю., Кирицели И., Крыленков В.А., Баранцевич Е.П., Соколов В.Т. Сравнительное исследование аэромикоты арктических станций по Северному морскому пути // Экология человека. 2018. № 4. С. 16–21.
- Габов Д.Н., Василевич Р.С., Яковлева Е.В., Зуева О.М. Ароматические соединения в бугристых торфяниках криолитозоны // Геоэкология. Инженерная геология. Гидрогеология. Геокриология. 2017. № 6. С. 15–29.
- Головацкая Е.А., Никонова Л.Г. Разложение растительных остатков в торфяных почвах олиготрофных болот // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2013. Т. 3. № 23. С. 137–151.
- Дину М.И., Губернаторова Т.Н. Основные пути разложения и трансформации гумусовых веществ почв под воздействием живых организмов // Вестник Тюменского государственного университета. 2013. № 12. С. 50–56.
- Елин Е.С. Фенольные соединения в биосфере. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2001. 392 с.
- Никифорова С.В., Позднякова Н.Н., Макаров О.Е., Чернышова М.П., Турковская О.В. Биоконверсия хризана грибом белой гнили *Pleurotus ostreatus* D1 // Микробиология. 2010. Т. 79. № 4. С. 481–485.
- Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1990. 325 с.
- Пастухов А.В., Каверин Д.А., Габов Д.Н. Полициклические ароматические углеводороды в мерзлотных бугристых торфяниках на европейском северо-востоке // Почвоведение. 2017. № 7. С. 814–823. [Pas-

- tukhov A.V., Kaverin D.A., Gabov D.N.* Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Cryogenic Peat Plateaus of Northeastern Europe // *Eurasian Soil Science*. 2017. V. 50. № 7. P. 805–813].
- Феофилова Е.П., Мысякина И.С.* Лигнин: химическое строение, биодеградация, практическое использование // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2016. Т. 52. № 6. С. 559–569.
- Хабибуллина Ф.М., Виноградова Ю.А., Дегтева С.В., Лантева Е.М.* Специфика формирования комплекса микромицетов в почвах островной поймы реки Ильич // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2012. Т. 14. № 1–8. С. 2082–2086.
- Яковлева Е.В., Безносиков В.А., Кондратенко Б.М., Габов Д.Н.* Биоаккумуляция полициклических ароматических углеводородов в системе почва – растение // *Агрохимия*. 2008. № 9. С. 66–74.
- Яковлева Е.В., Габов Д.Н., Безносиков В.А.* Влияние различных доз бенза[а]пирена на состав полициклических ароматических углеводородов в песчаной культуре // *Агрохимия*. 2015. № 6. С. 90–96.
- Andersson B.E., Lundstedt S., Tornberg K., Schnurer Y., Oberg L.G., Mattiasson B.* Incomplete degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil inoculated with wood-rotting fungi and their effect on the indigenous soil bacteria // *Environ Toxicol Chem*. 2003. V. 22. P. 1238–1243.
- Asemaninejada A., Greg Thorna R., Branfireuna B.A., Lindoa Z.* Climate change favours specific fungal communities in boreal peatlands // *Soil Biology and Biochemistry*. 2018. V. 120. P. 28–36.
- Atanassova I., Brummer G.W.* Polycyclic aromatic hydrocarbons of anthropogenic and biopedogenic origin in a colluviated hydromorphic soil of Western Europe // *Geoderma*. 2004. V. 120. P. 27–34.
- Berset J.D., Kuehnea P., Shotyk W.* Concentrations and distribution of some polychlorinated biphenyls PCBs and polycyclic aromatic hydrocarbons PAHs in an ombrotrophic peat bog profile of Switzerland. *The Science of the Total Environment*. 2001. V. 267. P. 67–85.
- Bozkurt S., Lucisano M., Moreno L., Neretnieks I.* Peat as a potential analogue for the long-term evolution in landfills // *Earth-science reviews*. 2001. Т. 53. V. 1–2. P. 95–147.
- Brien L.O., Langlois P.H., Lawson C.C., Scheuerle A., Rocheleau C.M., Waters M.A., Symanski E., Romitti P.A., Agopian A.J., Lupo P.J.* Maternal Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Craniosynostosis among Offspring in the National Birth Defects Prevention Study // *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2016. V. 106. № 1. P. 55–60.
- Byss M., Elhottova D., Tliska J., Baldrian P.* Fungal bioremediation of the creosote-contaminated soil: Influence of *Pleurotus ostreatus* and *Irpex lacteus* on polycyclic aromatic hydrocarbons removal and soil microbial community composition in the laboratory-scale study // *Chemosphere*. 2008 V. 73. P. 1518–1523.
- Cao H., Wang C., Liu H., Jia W., Sun H.* Enzyme activities during Benzo[a] pyrene degradation by the fungus *Lasiodiplodia theobromae* isolated from a polluted soil // *Scientific reports*. 2020. № 10. P. 865.
- Canet R., Birnstingl J.G., Malcolm D.G., Lopez-Real J.M., Beck A.J.* Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil // *Bioresour Technol*. 2001. V. 76. P. 113–117.
- Carvalho J.V.S., Mendonc E.S., Barbosa R.T., Reis E.Z., Seabr P.N., Schaefer C.E.G.R.* Impact of expected global warming on C mineralization in maritime Antarctic soils: results of laboratory experiments // *Antarctic Science*. 2010. V. 22. № 5. P. 485–493.
- Carvalho J.V.S., Mendonc E.S., Scala J.R.N., Reis C., Reis E.Z., Schaefer C.E.G.R.* CO<sub>2</sub>-C losses and carbon quality of selected Maritime Antarctic soils // *Antarctic Science*. 2013. V. 25. № 1. P. 11–18.
- Chen W., Wang H., Gao Q., Chen Y., Li S., Yang Y., Werner D., Tao S., Wang X.* Association of 16 priority polycyclic aromatic hydrocarbons with humic acid and humin fractions in a peat soil and implications for their long-term retention // *Environ. Pollut*. 2017. V. 230. P. 882–890.
- Cheng Y., Kong S., Yan Q., Liu H., Wang W., Chen K., Yin Y., Zheng H., Wu J., Yao L., Zeng X., Zheng S., Wu F., Niu Z., Zhang Y., Yan Y., Zheng M., Qi S.* Size-segregated emission factors and health risks of PAHs from residential coal flaming/smoldering combustion // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int*. 2019. V. 26. № 31. P. 31793–31803.
- DiDonato N., Chen H., Waggoner D., Hatcher P.G.* Potential origin and formation for molecular components of humic acids in soils // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2016. V. 178. P. 210–222.
- Hamdia H., Benzarti S., Manusadzianasc L., Aoyamaa I., Jedidid N.* Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions // *Soil Biology & Biochemistry*. V. 39. 2007. P. 1926–1935.
- Huang Z., Liers C., Ullrich R., Hofrichter M., Urynowicz M.* Depolymerization and solubilization of chemically pretreated powder river basin subbituminous coal by manganese peroxidase (MnP) from *Bjerkandera adusta* // *Fuel*. 2013. V. 112. P. 295–301.
- Grinhut T., Hadar Y., Chen Y.* Degradation and transformation of humic substances by saprotrophic fungi: processes and mechanisms // *Fungal biology reviews*. 2007. V. 21. P. 179–189.
- Janusza G., Kucharzykb K.H., Pawlika A., Staszczaka M., Paszczynskic A.J.* Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation // *Enzyme and Microbial Technology*. 2013. V. 52. P. 1–12.
- Li C., Gao S., Zhang J., Zhao L., Wang L.* Moisture Effect on Soil Humus Characteristics in a Laboratory Incubation Experiment // *Soil & Water Res*. 2016. V. 11. № 1. P. 37–43.
- Koschorreck K., Richter S.M., Swierczek A., Beifuss U., Schmid V.B., Urlacher R.D.* Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C–C coupling and oxidation of PAHs // *Arch. Biochem. Biophys*. 2008. V. 474. № 1. P. 213–219.
- Minkina T., Sushkova S., Yadav B.K., Rajput V., Mandzhieva S., Nazarenko O.* Accumulation and transformation of benzo[a]pyrene in Haplic Chernozem under artificial

- contamination // *Environ Geochem Health*. 2020. V. 42. № 8. P. 2485–2494.
- Novotny C., Svobodova K., Erbanova P., Cajthaml T., Kasinath A., Lang E., Sasek V. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate // *Soil Biol Biochem*. 2004. V. 36. P. 1545–1551.
- O'Brien M., Hashimoto T., Senda A., Nishida T., Takahashi J. The impact of *Lactobacillus plantarum* TUA1490L supernatant on *in vitro* rumen methanogenesis and fermentation // *Anaerobe*. 2013. V. 22. P. 137–140.
- Ren A. Environmental Pollutants and Neural Tube Defects // *Reproductive and Developmental Toxicology* (Second Edition). 2017. V. 61. P. 1139–1166.
- Thuens S., Blodau C., Radke M. How suitable are peat cores to study historical deposition of PAHs // *Science of the Total Environment*. 2013. V. 450–451. P. 271–279.
- Treseder K.K., Marusenko Y., Romero-Olivares A.L., Maltz M.R. Experimental warming alters potential function of the fungal community in boreal forest // *Glob Chang Biol*. 2016. V. 22. № 10. P. 3395–404.
- Sihi D., Ingletta P.W., Inglett K.S. Warming rate drives microbial nutrient demand and enzyme expression during peat decomposition // *Geoderma*. 2019. V. 336. P. 12–21.
- Ukalska-Jaruga A., Smreczak B., Klimkowicz-Pawlas A. Soil organic matter composition as a factor affecting the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons // *J. Soils Sedim*. 2019. V. 19. № 4. P. 1890–1900.
- Vasconcelos U., de França F.P., Oliveira F.J.S. Removal of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons // *Quim. Nova*. 2011. V. 34. № 2. P. 218–221.
- Wang Z., Liu S., Bu Z.-J., Wang S. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) during Sphagnum litters decay // *Environm. Sci. Pollut. Res*. 2018. V. 25. P. 18642–18650.
- Wilcke W. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil – a review // *J. Plant Nutr. Soil Sci*. 2000. V. 163. P. 229–248.
- Yakovleva E.V., Gabov D.N. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in *Betula nana* (Betulaceae, Magnoliopsida) under Exposure to a Thermal Power Plant // *Biology Bulletin*. 2019. V. 46. № 10. P. 1415–1425.
- Yakovleva E.V., Gabov D.N., Vasilevich R.S., Goncharova N.N. Participation of Plants in the Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Peatlands // *Eurasian Soil Science*. 2020. V. 53. P. 317–329.

## Temporal Changes in the Content of Polyarenes in Samples of Seasonally Thawed Layer from Tundra Peatlands During a Model Experiment

E. V. Yakovleva<sup>1, #</sup> and D. N. Gabov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Biology, Komi Science Center, Ural Branch, RAS, Kommunisticheskaya, 28, Syktyvkar, 167982 Russia*  
#e-mail: kaleeva@ib.komisc.ru

We conducted a model experiment on decomposition of organic matter in peat collected from a seasonally thawed layer of a tundra peatland on the coast of the Barents Sea. The data obtained indicate a constant variation in the composition of polycyclic aromatic hydrocarbons during the experiment. The changes in the content of polycyclic aromatic hydrocarbons can be described by a sinusoidal curve with several maxima and minima. We suggest that the presence of extrema in the content of polycyclic aromatic hydrocarbons and the recombination of their composition during the experiment is explained by the fact that, in the absence of easily accessible for decomposition light hydrocarbons, microorganisms began to decompose heavier structures, and then, with a decrease in their content, high-molecular-weight organic substances of peat. To confirm the obtained results, we plan to carry out additional studies of the enzymatic activity of soils.

**Keywords:** Model experiment, peatlands, organic matter, polycyclic aromatic hydrocarbons, decomposition



УДК 599.735.3(576.56)

## НОВЫЕ ДАННЫЕ ПО РАСПРОСТРАНЕНИЮ КАБАРГИ (*Moschus moschiferus*) В ЯКУТИИ

© 2022 г. А. В. Аргунов\*, @, В. М. Сафронов\*

\*Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск, 677007 Россия

@E-mail: argal2@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.07.2021 г.

После доработки 27.12.2021 г.

Принята к публикации 29.12.2021 г.

В настоящее время в Центральной Якутии на правом берегу р. Лены северная граница распространения сибирской кабарги продвинулась до устья и нижнего течения р. Алдан, на левом берегу — до пос. Еланка и р. Кетеме. Наиболее северные точки заходов по левому берегу р. Лены отмечены в 150 км от Якутска. Подвижка популяций кабарги обнаруживает связь с потеплением климата и увеличением высоты снежного покрова. Кабарга оседает во многих участках сравнительно малоснежной Центральной Якутии, включая таежно-аласные ландшафты с большим количеством населенных пунктов и значительными площадями сенокосных, пахотных и пастбищных угодий. В этом впервые проявляется способность вида к локальному заселению сельскохозяйственных районов с довольно высокой плотностью населения человека. Расширение ареала сибирской кабарги к северу на данном этапе не достигла южной границы распространения верхоянского подвида. В статье обсуждаются вопросы воздействия пресса охоты и хищников на численность кабарги, влияние пожаров на территориальное перераспределение этого вида.

**Ключевые слова:** Центральная Якутия, кабарга, подвид, ареал, ландшафты, расселение

**DOI:** 10.31857/S1026347022050031

В Якутии обитают два подвида кабарги — сибирский (*M. m. moschiferus*, Linnaeus, 1758) и верхоянский (*M. m. arcticus* Flerov, 1928) (Приходько, 2003, 2021). При широком распространении по горно-таежным, а местами равнинным ландшафтам, они заселяют сравнительно небольшое число предпочитаемых биотопов и характеризуются отчетливо выраженным мозаичным размещением в пределах ареала (Егоров, 1965, 1971; Ревин, 1989). Верхоянская кабарга населяет Верхоянский хребет, хр. Тас-Хаяхта, цепь Черского и Момский хребет. По Верхоянскому хребту она проникает до 69° с.ш., по бассейну р. Яна — до 70° с.ш. По левобережью р. Индигирки доходит до района Зашиверска, находящегося между кряжем Андрей-Тас и Момским хребтом, по правому берегу — до р. Мома (Бунге, 1887; Михель, 1938; Скалон и др., 1941; Егоров, 1965, 1971).

По более поздним сведениям верхоянский подвид встречается по р. Мома до Большой Момской наледи, в нижнем течении р. Эриkit и в верховьях р. Андыгычан — правого притока р. Нера. На Верхоянском хребте он обычен в лесных участках осевой части. На западных склонах этого хребта, обращенных к р. Лена и р. Алдан, численность кабарги меньше, чем на восточном макросклоне, переходящим в Янское плоскогорье. В

находящейся здесь системе верхних притоков р. Яна (Орто-Сала, Эгий, Дулгалах, Сартанг) плотность кабарги в 1994 г. достигала 5.6 экз/1000 га лесных угодий, в среднем, составляла 2.0 экз/1000 га, многочисленна — в Южном Верхоянье (Ревин и др., 1988; Степанова, Кривошапкин, 2001; Кривошапкин, 2008). Северо-восточная граница ареала ранее доходила до р. Колымы и ее правых притоков, позднее она сместилась к западу (Железнов, 1990). К востоку от цепи Черского кабарга встречается до верховьев рр. Чоломджа, Мылга, Хурен, Хинике, Правая Яна, Яма (Кишинский, 1967; Чернявский, 1984). Западная граница распространения верхоянской кабарги проходит по Приверхоянской водно-ледниковой равнине, узкая полоса которой, местами перекрытая горными отрогами, тянется вдоль р. Лены и р. Алдана на всем протяжении Верхоянского хребта.

Сибирский подвид кабарги широко распространен в Южной Якутии, в основном приурочен к Олекмо Чарскому и Алданскому нагорьям, многочислен в среднем и нижнем течении р. Олекма и ее притоков Чара и Токко, населяет бассейн верхнего Алдана и все его правые притоки, особенно бассейны рр. Учур, Гыным, Гонам, Сутам и Алгома. В 1993 г. плотность кабарги на Алданском нагорье колебалась от 3.5 до 10.0 экз/1000 га, в сред-

нем, составляла 5.0 экз/1000 га, на северных склонах Станового хребта малочисленна (Ревин, 1989; Степанова, Кривошапкин, 2001; Аргунов и др., 2017).

Западная Якутия входит в область распространения сибирского подвида (Приходько, 2003, 2021). В бассейне р. Виллой известны только редкие заходы кабарги со стороны р. Нижняя Тунгуска, южнее она заселяла левобережье р. Лены до бассейна р. Синяя (Егоров, 1971; Степанова, Кривошапкин, 2001).

В Центральной Якутии ранее кабарга отсутствовала (Скалон и др., 1941). Во второй половине прошлого века она обнаружена в районе Ленских Столбов и устья р. Буотама в пределах Приленского и Лено-Алданского плато (Егоров, 1971). Позднее кабарга широко заселила низменные леса Центральной Якутии вплоть до устья и нижнего течения р. Алдан.

Целью настоящей работы являются выявление причин и масштабов этого расселения и характеристика современного размещения вида в Центральной Якутии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Полевые исследования проводили в разных пунктах Центральной и Южной Якутии в период 2005–2020 гг. Некоторые данные по распространению кабарги получены попутно в ходе исследований численности и пространственной структуры сибирской косули и других видов диких копытных, которые дополняли опросными сведениями (Аргунов и др., 2015). Общая протяженность наземных маршрутов составила ~8 тыс. км. Для выявления территориального распределения кабарги использованы также данные зимнего маршрутного учета (ЗМУ) с 2006 по 2020 гг. Проанализированы фондовые материалы по охотничье-промысловым ресурсам Дирекции биологических ресурсов и Управления охотничьего хозяйства Министерства охраны природы Республики Саха (Якутия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исторический ареал кабарги испытывал многократные изменения в плейстоцене и голоцене в зависимости от смены климата, естественного преобразования ландшафтов и растительности (Верещагин, Барышников, 1980; Приходько, 2003). Центром формирования холодостойкой формы кабарги, как полагают, является рефугиум на территории Монголии, потомки которой в послеледниковый период заселили обширные горно-таежные системы на севере Азии (Приходько, 2021). На территорию Якутии кабарга проникла в среднем голоцене. На неолитических стоянках в бассейне р. Олекма и на Центрально-Якутской равнине в районе г. Якутска ее костные останки прослежи-

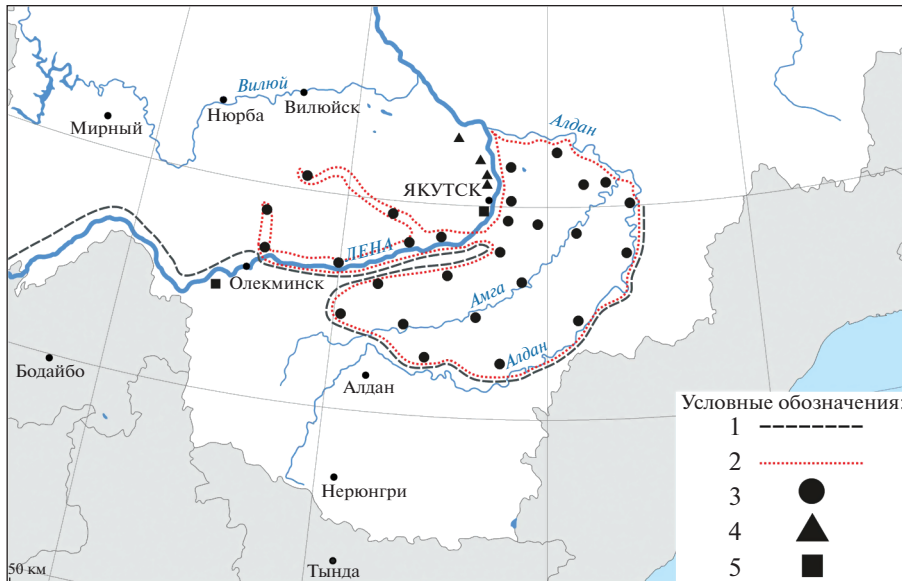
ваются со слоя с датировкой 2930 л. н. (Гарутт, 1950; Боескоров, 1998), относящегося к суббореальному периоду голоцена (2500–3400 л. н.) (Хотинский, 1977).

Центральная Якутия по численности населения и хозяйственной освоенности занимает ведущее место в Республике Саха (Якутия). Равнинный рельеф ее территории характеризуется несколькими уровнями. Наиболее возвышенная часть на западе и юго-востоке относится к древней денудационной равнине (270–350 м н. у. м.). ~50% территории покрыто древней аллювиальной равниной среднего уровня (160–220 м). Аллювиальная равнина верхнего уровня занимает 30% площади (200–270 м). Равнина нижнего уровня распространена (10%) в северной части региона (140–200 м). В лесном покрове Центральной Якутии преобладают разреженные лиственничные леса с травяно-брусничным покровом. Значительная часть территории занята таежно-аласными ландшафтами с большими площадями безлесных пространств с лугово-степной растительностью. В лиственничных ассоциациях мхи и лишайники в напочвенном покрове развиты слабо. Они больше распространены в сосновых лесах (6% от лесопокрытой территории), но после пожаров полностью исчезают в этих древостоях (Караваяев, Скрыбин, 1971). По средообразующим условиям Центральная Якутия на первый взгляд мало благоприятствует обитанию кабарги. Положительное значение для нее имеет характерная для региона небольшая высота снежного покрова (в среднем, 20–40 см), возросшая в связи с потеплением климата до 45–50 см.

**Лено-Амгинское междуречье.** За последние 50–60 лет граница распространения сибирской кабарги по правобережью р. Лены продвинулась на север от устья р. Буотама (Егоров, 1965) до устья р. Алдан (рис. 1). Затем она по левому берегу р. Алдан поворачивает на юго-восток, выходит к устью р. Амга, а далее смыкается с восточной границей прежнего ареала, очерченного О.В. Егоровым (1971).

Вдоль левого берега р. Алдан кабарга постоянно встречается в настоящее время в окрестностях пос. Чериктей (Усть-Алданский район), Усть-Татта (Таттинский район), в районе “Мамонтовой горы” с обрывами высотой 60–80 м. Внутри границ приалданской части ареала она по рр. Татта, Баяга и Танда выходит на водораздельные территории. Стала обычной в аласно-таежной зоне — вблизи пос. Ытык-Кюель (Таттинский район), Танда, Онер и Кептени (Усть-Алданский район). По р. Амга распространена на всем ее протяжении от устья до истоков.

Вдоль р. Лены между устьями рр. Буотама и Алдан кабарга населяет узкую прибрежную полосу (2–3 км) надпойменной террасы, сложенную в основном песчаным грунтом и поросшую сосно-



**Рис. 1.** Распространение сибирского подвида кабарги в Центральной Якутии: 1 – граница ареала в 1960-е гг. (Егоров, 1965); 2 – в 1990–2000-е гг.; 3 – места обитания кабарги; 4 – пункты заходов вида; 5 – пункты находок костных остатков кабарги на неолитических стоянках (Гарутт, 1950; Боескоров, 1998; Боескоров, 2003).

выми и лиственничными лесами (рис. 2). Здесь в Хангаласском и Мегино-Кангаласском районах по берегу р. Лены расположены довольно крупные населенные пункты, между которыми она редка. Ближе к устью р. Алдан, в Намском районе, поселков меньше, встречаемость кабарги увеличивается, плотность достигает местами 5.0 экз./1000 га. На постоянных маршрутах с 2002 по 2020 г. здесь отмечались на 1 км по 1–3 “уборных” кабарги.

На Лено-Амгинском междуречье устойчивые поселения кабарги находятся на северной окраине Приленского плато по правым притокам р. Лены – Лютенге, Менде и Тамма с каменистыми выходами по берегам. Далее к северу по р. Суола, имеющей равнинный характер, кабарги меньше. В преобладающих на Лено-Амгинском междуречье таежно-аласных ландшафтах кабарга осваивает в основном участки с усложненным рельефом по бортам водотоков и краям аласных котловин (рис. 3). Небольшие запасы наземных и древесных лишайников – основной пищи кабарги – восполняются здесь обилием травянистых и кустарниковых кормов. Защитные условия местообитаний улучшают густые лиственничные молодняки на многочисленных старых гарях, заросли ольхи и ерников в разреженных древостоях. Тем не менее, в целом на этой территории кабарга размещена рассеянно и встречается далеко не везде.

По опросным сведениям, отдельные группировки кабарги в местах расположения пос. Бютейдях и Табага (верхнее течение р. Суола) и Туора-Кюель (водораздел рр. Баяга и Татта) постоянно встречались еще в 1960–1970 гг. Интересно сообщение

председателя родовой общины “Кырбыкан” Иванова А.П. о том, что в устье р. Мундуруччу (левый приток р. Амга в северной части Приленского плато) в 1940-х гг. семья кочевых эвенков-оленьеводов добыла за один летний период 20 кабарог. Далее к северу с понижением рельефа кабарга в те годы, по-видимому, не шла. Известно, что сезонные переходы кабарги непродолжительны и происходят в основном по склонам разной экспозиции и крутизны (Егоров, 1971). На местообитания, занятые внутривидовыми группировками вида, приходится лишь 30–50%, а иногда 15% заселенной площади. В северной части ареала микрогруппировки кабарги могут быть удалены одна от другой



**Рис. 2.** Правый коренной берег р. Лены.



Рис. 3. Типичный алас Лено-Амгинского междуречья.

на 15–20 км (Приходько, 2003, 2021). По данным Ю.В. Ревина (1989) распространение кабарги не бывает сплошным даже в Южной Якутии, что затрудняет оценку ее общих запасов в ареале. Необходимо отметить, что это не учитывается при определении численности вида методом ЗМУ. При экстраполяции показателей плотности кабарги в расчеты вводится вся лесопокрытая площадь районов обитания, что приводит к многократному завышению ее численности

**Лено-Вилуйское междуречье.** В середине прошлого века сибирская кабарга населяла левобережную долину р. Лены от рр. Нюя и Пеледуй до г. Олекминска (Егоров, 1971). Позднее она продвинулась к северу до нижнего течения р. Синяя (Степанова, Кривошапкин, 2001; Кривошапкин, 2008). В настоящее время в Олекминском районе она по скалистым берегам р. Намана дошла до местности Ет-Кюель (80 км от устья), но далее с исчезновением каменистых обнажений не идет (рис.1).

По р. Лене кабарга распространилась до пос. Еланка и устья р. Кетеме, по которой заходит на 10–15 км в пределах скальных выходов. Ниже по р. Лене отмечались редкие заходы кабарги до пос. Сырдах и Кильдемцы в районе г. Якутска. Известны факты добычи кабарги в 1980 г. близ оз. Белое на террасе р. Лены напротив устья р. Алдан (150 км севернее г. Якутска), а в 1993 г. около пос. Намцы. Изредка она встречается у пос. Хомустах в Намском районе. В литературе сообщалось о добыче кабарги в окрестностях пос. Маган недалеко от г. Якутска (Мордосов, Прокопьев, 2015). Все эти участки характеризуются сглаженным рельефом и отсутствием скал.

Постоянное население сибирской кабарги сохраняется в бассейне р. Синяя. В нижнем течении эта река прорезает Приленское плато с образованием сплошной гряды скальных останцев по берегам, привлекающих кабаргу. Однако в 100–150 км от устья к левому берегу реки вплотную подступает

Центрально-Якутская равнина, где кабарга крайне редка или отсутствует. По приподнятому правобережью р. Синяя она обитает до верховьев.

Положительным фактором для кабарги в Центральной Якутии является сравнительно небольшое распространение волка в связи с множеством населенных пунктов и разветвленной сетью автомобильных проселочных дорог. Здесь сосредоточено наибольшее в Якутии количество ското-коневодческих хозяйств и ведется активная борьба с волком. Общее влияние хищников (волк, лисица, россомаха, рысь, соболь) на численность кабарги в этом регионе невелико, что отмечалось и ранее (Мордосов, Прокопьев, 2015).

С потеплением климата и увеличением высоты снега, ограничивающем подвижность кабарги, воздействие хищников на ее численность могло усиливаться, особенно в горно-таежной зоне с большой мощностью снежного покрова (70–90 см). При глубоком снеге кабаргу начинает активно преследовать даже соболь (Бакеев и др., 2003; Смирнов и др., 2003; Зырянов, 2009; Олейников, Зайцев, 2014). В Центральной Якутии соболь менее многочислен (0.2–1.7 экз./1000 га), чем в Южной (2.4–3.7 экз./1000 га), что благоприятствует переселяющейся сюда кабарге. Сходное перемещение ареала в Центральную Якутию, обусловленное потеплением климата и увеличением снежности, наблюдается у благородного оленя и некоторых других видов млекопитающих (Сафронов, 2016; Степанова, Аргунов, 2016; Аргунов, 2018).

Большое влияние на перекочевки кабарги в последние годы оказывает увеличение частоты и площади лесных пожаров, сокращающих площадь основных мест обитаний и кормовые ресурсы (ягель и древесные лишайники) вида на больших территориях. Негативные последствия от пожаров описаны для многих районов ареала кабарги и в полной мере проявляются в Якутии (Зайцев, 2006; Доманов, 2017; Приходько, 2021). В 2020 г. в республике сгорело 3.9 млн га тайги (1.5% от общей площади лесов), огнем было пройдено около 6 млн. га. В 2021 г. пройденная пожарами площадь оценена в 8 млн. га (3.1% лесов), чем нанесен колоссальный ущерб лесным и животным ресурсам.

Влияние браконьерства на численность кабарги в горных и равнинных районах Якутии сравнительно невелико. Ранее она была попутной добычей при массовых загонах зайца-беляка на больших площадях, проводившихся до начала 1990-х гг. Прекращение такой охоты в связи с длительной депрессией зайца существенно снизило охотничье изъятие кабарги, способствовало увеличению ее численности и распространения в Центральной Якутии.



\* \* \*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Широкое распространение кабарги в Центральной Якутии с равнинным и аласно-котловинным рельефом меняет представление о тесной связи этого вида с горно-таежными ландшафтами. Однако нельзя не заметить, что и здесь более устойчивые поселения ее приурочены к долинам рек со скальными обнажениями и крутыми берегами. Повышенная биотопическая избирательность, привязанность к постоянным местам обитания, небольшие перекочевки в пределах участков со сходной структурой рельефа и растительности, присутствие кабарге, свидетельствуют о чрезвычайном характере ее экспансии в Центральную Якутию. Прежде всего, она обусловлена потеплением климата, начавшимся в 1970–1980 гг., увеличением высоты снежного покрова в горно-таежной зоне и передислокацией части популяции в сравнительно малоснежную центральную часть Якутии. Примером подобных пульсаций ареала кабарги под влиянием климатических факторов являются многочисленные флуктуации ее распространения в прошлом (см. выше). Растянутые сроки и замедленные темпы расселения соответствуют видовым особенностям кабарги. После частичного оседания в Центральной Якутии не исключено и обратное движение животных на Приленское плато и далее, мало заметное из-за их скрытности и диффузного распределения. Перемещение северной границы ареала сибирской кабарги до устья и нижнего течения р. Алдан на данном этапе не достигло южных границ распространения верхоянского подвида.

В заселении сибирской кабаргой таежно-аласной зоны Якутии с большими площадями сенокосных, пахотных и пастбищных угодий впервые проявляется ее способность к локальному освоению равнинных сельскохозяйственных районов, свидетельствуя об определенной экологической пластичности и толерантности к присутствию человека этого, в общем-то, стенотопного вида.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ИБПК СО РАН по проекту “Причинно-следственные основы динамики почвенного покрова и наземных экосистем криолитозоны на территории распространения легких пород в Центральной Якутии для разработки фундаментальных основ охраны квазиравновесных риксерогенных территорий” (тема 0297-2021-0044; рег. номер АААА-А21-121012190036-6) и Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по проекту “Популяция и сообщество животных водных и наземных экосистем криолитозоны восточного сектора российской Арктики и Субарктики: разнообразие, структура и устойчивость в условиях естественных и антропогенных воздействий” (тема 0297-2021-0044, ЕГИСУ НИОКТР № 121020500194-9).

- Аргунов А.В., Степанова В.В., Охлопков И.М.* Динамика численности и использование ресурсов диких копытных в таежной части Якутии // *Аграрный вестник Урала*. 2017. № 7(161). С. 4–11.
- Аргунов А.В.* Чужеродные виды териофауны Якутии // *Рос. журн. биологических инвазий*. 2018. Т. 11. № 3. С. 20–38.
- Аргунов А.В., Кривошапкин А.А., Боескоров Г.Г.* Косуля Центральной Якутии. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2015. 123 с.
- Бакеев Н.Н., Монахов Г.И., Сеницын А.А.* Соболь. Вятка: ГНУ ВНИИОЗ, 2003. 336 с.
- Балобаев В.Т.* Глобальные изменения климата и мерзлота // *Наука и образование*. Якутск. 1997. № 6. С. 82–90.
- Боескоров Г.Г.* К вопросу об изменении состава териофауны Якутии с конца плейстоцена и в голоцене (по археологическим данным) // *Млекопитающие антропогена Якутии*. Якутск: Якутский научный центр СО РАН, 1998. С. 126–137.
- Боескоров Г.Г.* Состав териофауны Якутии в позднем плейстоцене и голоцене (по археологическим материалам) // *Древние культуры Северо-Восточной Азии*. Астроархеология. Палеоинформатика. Новосибирск: Наука, Сиб. Издат. Фирма РАН, 2003. С. 27–43.
- Бунге А.А.* Предварительный отчет об экспедиции на Новосибирские острова // *Изв. Русского геогр. об-ва*. Т. 23. СПб., 1887. С. 573–591.
- Верещагин Н.К., Барышников Г.Ф.* Ареалы копытных СССР в антропогене // *Труды Института зоологии АН СССР*. Л.: Наука, 1980. Т. 93. С. 3–30.
- Гарутт В.Е.* Фауна неолитической стоянки Куллаты // *Ленские древности*. Вып. 3. М.–Л.: Изд-во АН СССР, 1950. С. 178–185.
- Доманов Т.А.* Изменение структуры местообитаний кабарги (*Moschus Moschiferus* L. 1758) в Амурской области под влиянием лесных пожаров // В сборнике: *Климат, экология, сельское хозяйство Евразии*. Современные проблемы охотоведения. Мат. VI международной научно-практической конференции и первого межрегионального симпозиума работников охотничьего хозяйства России. 2017. С. 183–188.
- Егоров О.В.* Дикие копытные Якутии. М.: Наука, 1965. 259 с.
- Егоров О.В.* Кабарга // *Млекопитающие Якутии*. М., 1971. С. 517–527.
- Железнов Н.К.* Дикие копытные Северо-Востока СССР. Владивосток: ДВО АН СССР, 1990. 480 с.
- Зайцев В.А.* Кабарга: экология, динамика численности, перспективы сохранения. М.: Изд-во Центра охраны дикой природы, 2006. 120 с.
- Зырянов А.Н.* Соболь Средней Сибири. Красноярск. 2009. 256 с.
- Караваев М.Н., Скрябин С.З.* Растительный мир Якутии. Якутск: Якутское книжное изд-во, 1971. 128 с.
- Кищинский А.А.* Материалы о распространении диких копытных в Северо-Восточной Сибири // *Проблемы Севера*. М.: Наука, 1967. Вып. 11. С. 142–148.

- Кривошапкин А.А.* Кабарга (*Moschus moschiferus* Linnaeus, 1758) в Якутии // Вестник Якутского государственного университета. 2008. Т. 5. № 3. С. 5–9.
- Михель Н.М.* Промысловые звери Северо-Восточной Якутии. Л.: Изд-во Главсевморпути, 1938. 96 с.
- Мордосов И.И., Прокопьев Н.П.* Млекопитающие Лено-Алданского междуречья. Якутск: Издательский дом СВФУ, 2015. 268 с.
- Олейников А.Ю., Зайцев В.А.* Охота соболя (*Martes Zibellina*) на кабаргу (*Moschus moschiferus*) // Бюллетень Московского общества испытателей общества природы. Отдел биологический. 2014. Т. 119. № 6. С. 20–28.
- Приходько В.И.* Кабарга: происхождение, систематика, экология, поведение и коммуникация. М.: Геос, 2003. 443 с.
- Приходько В.И.* Кабарга, ресурсы сохранение вида в России. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2021. 203 с.
- Ревин Ю.В., Сафронов В.М., Вольперт Я.Л., Попов А.Л.* Экология и динамика численности млекопитающих Предверхоянья. Новосибирск: Наука, 1988. 200 с.
- Ревин Ю.В.* Млекопитающие Южной Якутии. Новосибирск: Наука, 1989. 321 с.
- Сафронов В.М.* Изменение климата и млекопитающие Якутии // Зоологический журн. 2016. Т. 95. № 12. С. 1459–1474.
- Скалон В., Щербаков И., Базыкин М.* Новые материалы по распространению промысловых млекопитающих в Якутии // Природа и соц. хоз-во. 1941. Сб. 8. Ч. 2. С. 23–34.
- Смирнов М., Туманов И., Кожечкин В.* Кабарга и ее враги // Охота и охотничье хозяйство. 2003. № 9. С. 2–4.
- Степанова В.В., Аргунов А.В.* Пространственно-временная динамика ареалов благородного оленя (*Cervus elaphus*, Cervidae) и сибирской косули (*Capreolus pugnax*, Cervidae) в Якутии // Экология. 2016. № 1. С. 50–55.
- Степанова В.В., Кривошапкин А.А.* Материалы по биологии диких копытных Якутии. Изюбрь (*Cervus elaphus* L.), кабарга (*Moschus moschiferus* L.) // Наука и образование. Якутск. 2001. № 1(21). С. 130–133.
- Флеров К.К.* Кабарга и олени // Фауна СССР. Млекопитающие. М.–Л.: Изд-во АН СССР, 1952. Т. 1. Вып. 2. 256 с.
- Чернявский Ф.Б.* Млекопитающие крайнего северо-востока Сибири. М.: Наука, 1984. 388 с.
- Хотинский Н.А.* Голоцен Северной Евразии. М.: Наука, 1977. 200 с.

## New Data on the Distribution of Musk Deer (*Moschus moschiferus*) in Yakutia

A. V. Argunov<sup>1, #</sup> and V. M. Safronov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute for Biological Problems of Cryolithozone SB RAS, Yakutsk, 677007 Russia  
#e-mail: argal2@yandex.ru

At the present, in Central Yakutia, on the right bank of the Lena River, the northern border of the Siberian musk deer area has shifted to the mouth and lower Aldan River, and on the left bank area it shifted to Elanka village and Keteme River. The northernmost visit points on the Lena River left bank are marked 150 km from Yakutsk city. The movement of musk deer populations reveals a connection with the climate warming and the snow cover height increase. Musk deer settle in many relatively snow-free areas in Yakutia, including taiga-alas landscapes with a large number of settlements and significant areas of agricultural land. This is the first time that the ability of the species to settle locally in agricultural areas with a fairly high human population density is shown. The expansion of the Siberian musk deer range to the north at this stage has not reached the southern limit of Verkhoyansk subspecies distribution. The article discusses the impact of hunting pressure and predators on the number of musk deer, the impact of fires on the territorial redistribution of this species.

*Keywords:* Central Yakutia, musk deer, subspecies, range, landscapes, settlement



КРАТКИЕ  
СООБЩЕНИЯ

УДК 595.773.4:591.582

ПЕРВАЯ РЕГИСТРАЦИЯ ВИБРАЦИОННЫХ СИГНАЛОВ  
У МУХ РОДА *Meromyza* (DIPTERA, CHLOROPIDAE)

© 2022 г. А. А. Яцук\*, @, Л. С. Шестаков\*\*

\*ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН,  
Ленинский просп., 33, Москва, 119071 Россия\*\*ФГБУН Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН,  
Большой Каретный пер., 19, Москва, 127051 Россия

@E-mail: sasha\_djedi@mail.ru

Поступила в редакцию 16.04.2021 г.

После доработки 10.12.2021 г.

Принята к публикации 10.01.2022 г.

В статье приводится первое описание вибрационных сигналов самок двух видов злаковых мух рода *Meromyza*. Длительность сигнала самок *Meromyza saltatrix* составляет в  $0.153 \pm 0.06$  с, частотный диапазон — от 229 до 650 Гц. Длительность сигнала самок *Meromyza femorata* составляет, в среднем,  $0.142 \pm 0.12$  с, частотный диапазон — от 183 до 368 Гц. Зарегистрированные сигналы мух рода *Meromyza* отличаются от известных сигналов мух из соседних родов и семейств.

**Ключевые слова:** Chloropidae, *Meromyza*, прекопуляционное поведение, вибрационные сигналы

**DOI:** 10.31857/S1026347022040163

Акустические и вибрационные сигналы часто являются неотъемлемым элементом брачного поведения, одним из механизмов прекопуляционной межвидовой изоляции и важным фактором полового отбора (Тишечкин, Веденина, 2016). У двукрылых обнаружены следующие типы сигналов: звуки, передаваемые с помощью воздушной среды, производимые вибрацией крыльев или других придатков; звуки, передаваемые с помощью вибрации субстрата (Kanmiya, 2006).

Насекомые могут использовать различные субстраты для коммуникации. Одним из основных субстратов для коммуникации являются растения (Michelsen *et al.*, 1982; Coscoft, Rodriguez, 2005.). Считается, что сигналы насекомых оптимально приспособлены к тому типу субстрата, на котором осуществляется коммуникация (Coscoft, Rodriguez, 2005).

Для короткоусых двукрылых известно, что вибрационная коммуникация является частью видоспецифичного прекопуляционного поведения у представителей семейств Drosophilidae (Hoy *et al.*, 1988, Mazzoni *et al.*, 2013), Agromyzidae (Ge *et al.*, 2019), Tephritidae (Webb *et al.*, 1983) и Chloropidae (Kanmiya, 1990; Kanmiya, 2006.).

Настоящая работа посвящена изучению вибрационной коммуникации у мух рода *Meromyza* (Meigen, 1830), которые представляются хорошим

модельным объектом для исследования механизмов межвидовой изоляции, благодаря высокой изученности эволюционных и филогенетических взаимоотношений между видами (Яцук, 2019), а также из-за наличия развитой системы вибрационных сигналов у представителей близких родов (Kanmiya, 1990; Kanmiya, 2006). Род *Meromyza* относится к семейству Chloropidae, которое является на открытых стациях едва ли не самой массовой группой двукрылых (Нарчук, 1987). Имаго меромиз приурочены к открытым стациям с низким травостоем, где одновременно встречается несколько разных видов (Лескова, 1953, Пантелева, 1989). Использование одинаковых биоценозов разными видами предполагает существование механизмов репродуктивной изоляции на пре-, копулятивном и посткопулятивном уровнях, не связанных с экологическими или географическими преградами. Одним из таких механизмов могут быть видоспецифичные вибрационные сигналы, как это было установлено для хлоропид рода *Calamocosis* (Enderlein, 1911) (Kanmiya, 2006) и *Lipara* (Meigen, 1830) (Kanmiya, 1990).

Цель данной работы заключается в проверке предположения об использовании меромизами вибрационных сигналов при прекопуляционном поведении и предварительной оценке возможно-

**Таблица 1.** Параметры вибрационных сигналов и вибрационных колебаний ( $X_{\text{ср}} \pm X_{\text{ст. откл}}$ ) у *M. saltatrix* и *M. femorata*

Параметр	Прекапуляционный сигнал самок <i>M. saltatrix</i>	Прекапуляционный сигнал самок <i>M. femorata</i>	Вибрационные колебания при прыжках самцов <i>M. femorata</i>	Тремуляция брюшка во время копуляции <i>M. femorata</i>
Длительность сигнала (с)	$0.153 \pm 0.06$	$0.142 \pm 0.12$	$0.28 \pm 0.07$	$0.296 \pm 0.026$
Диапазон частот (Гц)	229–650	183–368	292–602	420–700
Преобладающая частота (Гц)	Начальная часть сигнала $645 \pm 0.08$ ; Остальная часть сигнала $240 \pm 10.6$	Начальная часть сигнала $306 \pm 58$ ; остальная часть сигнала $239 \pm 54$	$380 \pm 84$	$621.25 \pm 18$
Период повторения (с)	$1.13 \pm 0.13$	$2.24 \pm 0.59$	–	$13.58 \pm 21.76$

сти их использования для идентификации видов рода *Meromyza*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для данной работы послужили записи вибрационных сигналов видов *Meromyza femorata* (Macquart, 1835) (записано 6 особей), сделанные в июле 2019 г., и *Meromyza saltatrix* (L., 1761) (записано 3 особи), сделанные в июне 2020 г., в Москве (координаты места сбора: 55.7120206, 37.5878901). Были зарегистрированы прекопуляционные сигналы самок. Самцы во время конспецифических взаимодействий явных сигналов не издавали, при встрече с рецептивной самкой сразу пытались копулировать. У вида *M. femorata* был зарегистрирован сигнал, издаваемый в процессе копуляции. У самцов этого вида были дополнительно записаны вибрационные колебания, создаваемые ими при прыжках.

Эксперименты проводили при температуре 19–24°C. Именно этот диапазон температур наиболее оптимален для нормальной активности мериомиз (Nishijima, 1960).

Вибрационные сигналы регистрировали с помощью монофонического пьезокристаллического адаптера ГЗК-661. Калибровку оборудования проводили с помощью лазерного вибрметра PDV 100 (“Polytec”, Germany) и вибростенда 4810 (Bruel & Kjaer). Подобная методика записи вибрационных сигналов в полевых условиях является одной из наиболее распространенных, и описана в работах Шестакова (2015) и Тишечкина (Tishechkin, 2015). Во время записи сигналов мухи

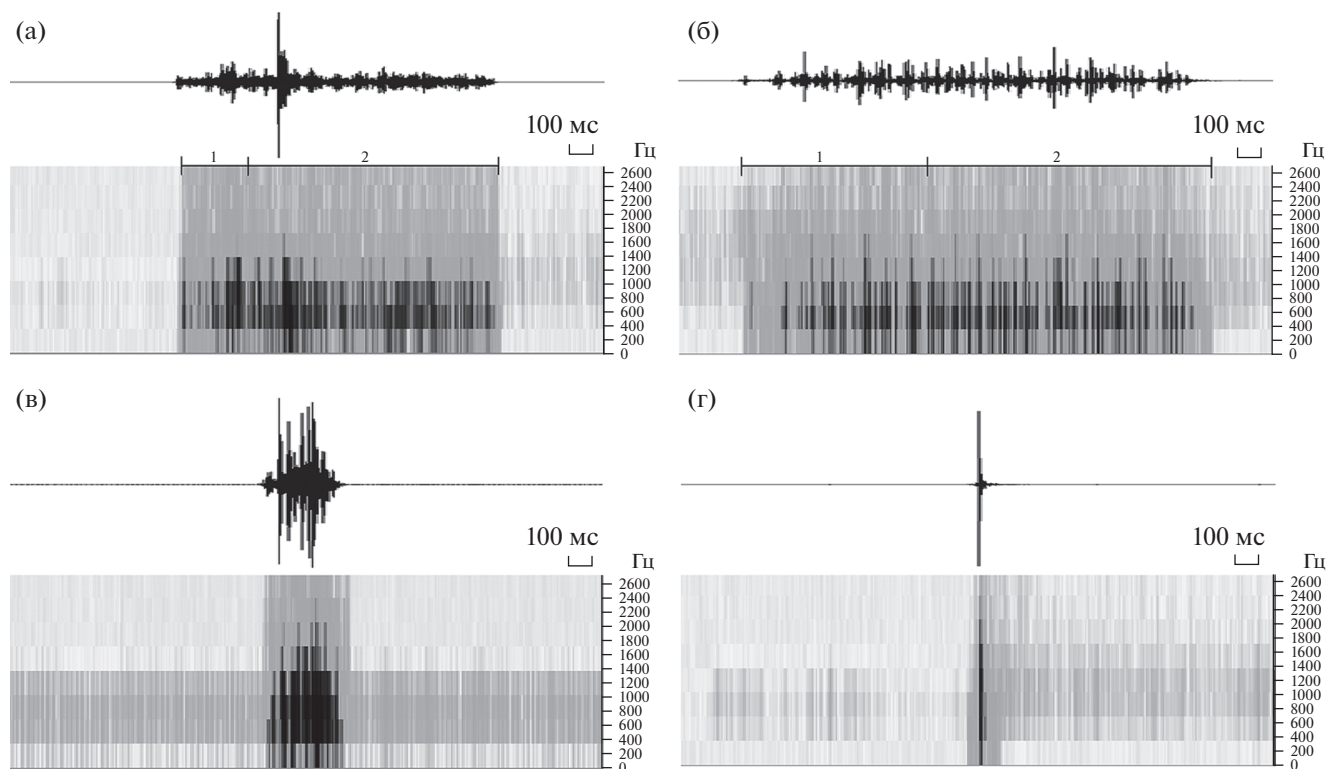
находились в широкой пластиковой пробирке объемом 50 мл и диаметром 3 см, закрытой бумажной мембраной, через которую были просунуты свежие соломины злаков. Адаптер ГЗК-661 был присоединен к соломинам. Одновременно с записью вибрационных сигналов велось визуальное наблюдение за поведением исследуемых мух. Во время эксперимента в пробирке находилось от 5 до 10 особей, среди которых было не менее двух самок и не менее двух самцов, поскольку определить готовность к спариванию у конкретной особи не представлялось возможным.

Анализ и измерение параметров сигналов осуществляли с использованием программы CoolEdit Pro (“Syntrillium software corporation”, США).

Статистическую обработку данных (критерий Стьюдента) проводили в программах Microsoft Office Excel 2007 (“Microsoft Corporation”, США) и Statistica 10 (“StatSoft, Inc.”, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У самок *M. saltatrix* и *M. femorata* обнаружены вибрационные сигналы, издаваемые при контактах с самцами перед копуляцией. Данные сигналы производились тремулацией брюшка. Во время эмиссии сигнала самка трясет брюшком, не касаясь субстрата. Длительность сигнала самок *M. saltatrix* составляет, в среднем, 0.153 с, спектр сигнала шумовой, частотный диапазон – от 229 до 650 Гц. Длительность сигнала самок *M. femorata* составляет, в среднем, 0.142 с, спектр сигнала так же шумовой, частотный диапазон – от 183 до 368 Гц. Подробные параметры длительностей



**Рис. 1.** Осциллограммы и сонограммы зарегистрированных сигналов и вибрационных колебаний меромиз: прекопуляционный сигнал самок *M. saltatrix* (а), *M. femorata* (б), тремуляция брюшка во время копуляции *M. femorata* (в), вибрационные колебания во время прыжка самца *M. femorata* (г); 1 – начальная часть сигнала, 2 – остальная часть сигнала.

пульса, частоты, периода повторения для записанных сигналов указаны в таблице 1. Сонограммы и осциллограммы для сигналов приведены на рис. 1.

Частотный диапазон сигнала самок *M. saltatrix* шире, чем у сигнала самок *M. femorata*. Внутри этих сигналов можно выделить начальную часть и остальную по заметному изменению преобладающей частоты. Преобладающая частота начальной части сигнала у самок *M. saltatrix* составляет 645 Гц, а остальной части – 240 Гц. У самок *M. femorata* преобладающая частота начальной части сигнала составляет 306 Гц, а остальной части – 239 Гц. Критерий Стьюдента показал достоверные отличия начальной части сигнала самок *M. femorata* от *M. saltatrix* ( $t_{st} = 10.12$ ;  $df = 4$ ;  $p = 0.000$ ). При этом уровень внутривидовой изменчивости записанных сигналов не превышает межвидовых различий.

Согласно нашим наблюдениям, меромизы при передвижении часто используют прыжки, которые представляют собой резкое перемещение вперед на большое расстояние за счет быстрого разгибания задних ног. Вибрации, создаваемые прыжками, могут быть частью прекопуляционно-

го поведения. У самки *M. femorata* перед копуляцией наблюдается снижение двигательной активности и расправление крыльев, в то время как самец перемещается с места на место вокруг нее в т. ч. и с помощью прыжков. Параметры вибрационных колебаний, создаваемых самцами во время прыжков, представлены в таблице. Как только самка издает сигнал, самец приземляется на нее сверху и начинается процесс копуляции. Между замиранием самки и началом копуляции проходит  $18 \pm 2$  с. Во время копуляции мухи могут перемещаться по субстрату и могут совершать прыжки, иногда останавливаясь на месте. Периодически самец начинает особенно интенсивно двигать брюшком (тремуляция брюшка во время копуляции). Частотный диапазон тремуляции брюшка во время копуляции у *M. femorata* составляет 420–700 Гц. Подробные параметры сигнала указаны в таблице. Сонограмма и осциллограмма приведены на рис. 1. Процесс копуляции продолжается  $13 \pm 0.4$  мин. Интересно отметить, что издавать сигналы и копулировать мухи начинали только при ярком солнечном освещении.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы предполагаем, что у меромиз сигналы самок могут нести информационную функцию при распознавании конспецифичного полового партнера и являются частью ритуала ухаживания. Поскольку сигналов самцов при конспецифических взаимодействиях не зарегистрировано, можно предположить, что сигналы такого типа сохранились в процессе эволюции только у самок. Косвенным подтверждением этой гипотезы является то, что у представителей близкого к меромизам рода *Lipara* (Meigen, 1830) сигналы самцов весьма вариабельны и сильно различаются между географическими популяциями, в то время как сигналы самок практически не подвержены географической изменчивости и более надежны в качестве видоспецифичных признаков при различении близких таксонов (Kanmiya, 1990). Эти данные говорят о том, что сигналы самок злаковых мух потенциально могут быть использованы как таксономический признак при идентификации видов. Зарегистрированные нами сигналы самок двух видов меромиз подтверждают это предположение, так как они достоверно различаются по частотным параметрам. В свою очередь, самцы могут использовать другие типы сигналов (визуальные, химические и т.д.) в процессе ухаживания. Так, у видов *Drosophila persimilis* (Dobzhansky, Epling, 1944) и *D. pseudoobscura* (Frolova, 1929) помимо вибрационных и тактильных сигналов используются визуальные сигналы (Hernández, Fabre, 2016).

У представителей некоторых групп двукрылых, близких к роду *Meromyza*, известны вибрационные сигналы самок, которые играют важную роль во внутривидовой коммуникации. Так, у представителей рода *Calamoncosis* (Enderlein, 1911), чьи личинки по морфологии и биологии близки к меромизам (Нарчук, 1987), сигналы самок состоят из нескольких предварительных колебаний с последующей одиночной непрерывной вибрацией (Kanmiya, 2006), в то время как спектр сигнала самок меромиз шумовой. У вида *Lipara lucens* (Meigen, 1830) (также близкого к роду *Meromyza*) после выхода из галлов самки остаются малоподвижными, а самцы перемещаются между стеблями в поисках партнерши для спаривания, издавая при этом сигнал, состоящий из двух фраз (Kanmiya, 1990). Сигналы самок *L. lucens* по своей частоте отличаются от сигналов самок рода *Meromyza*. По тем же параметрам отличается от них и *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard, 1926), представитель соседнего семейства Agromyzidae (Ge et al., 2019). Теоретически, все эти отличия могут обеспечивать успешную одновременную коммуника-

цию этих видов в одном биотопе, где встречаются кормовые растения всех перечисленных групп мух.

Различия преобладающих частот начальной части сигналов самок *M. femorata* и самок *M. saltatrix* могут быть обусловлены совпадением фенологии этих видов. Лёт имаго *M. saltatrix* идет с мая до начала августа, а *M. femorata* — с июля по август. При этом данные виды способны населять одни и те же биотопы (Федосеева, 1961).

Прыжки также могут являться частью прекопуляционного поведения. Триба Meromyzini, в которую входит род *Meromyza*, отличается от других групп семейства Chloropidae утолщенными бедрышками задних ног, позволяющими такой способ перемещения (Нарчук, 1987).

Тремудация брюшка самцов *M. femorata* во время копуляции возможно связана с выделением феромонов, с тактильным стимулом к продолжению копуляции, а также с передачей спермы, как, например, предполагается для копулятивных сигналов самок некоторых видов *Drosophila* (Fallen, 1823) (Kerwin, Philipsborn, 2020).

Отсутствие у самцов выраженных призывных вибрационных сигналов можно объяснить тем, что для некоторых групп двукрылых известны такие поведенческие особенности как скопления в особых “местах встречи”, которые позволяют обеспечить возможность использования систем прекопуляционной коммуникации ближнего действия. Например, самцы видов рода *Anastrepha* (Schiner, 1868) (Diptera, Tephritidae) образуют скопления на вершинах деревьев (Arita, Kaneshiro, 1989). Известно, что меромизы предпочитают более низкую и редкую растительность (Лескова, 1953; Hughes, 1955), что может являться специальным местом встречи у самок и самцов меромиз. Ранее, в работах Лесковой (1953) и Hughes (1955) была выдвинута гипотеза о том, что приуроченность меромиз к низкому травостою связана с хорошей освещенностью внутри растительности. В этом случае можно ожидать наличия важных визуальных сигналов в ритуале ухаживания. Известно, что вибрации с частотой от 100 до 500 Гц распространяются по растениям с минимальными потерями энергии (Michelsen et al., 1982; Cokl, Virant–Doberlet, 2003), однако междуузлия гасят сигнал (Cokl, Virant–Doberlet, 2003), что может вынуждать меромиз скапливаться для поиска партнера на участках с низкой травой для максимально эффективной передачи вибрационных сигналов. Можно предположить, что в ритуале ухаживания меромиз есть как вибрационные сигналы, так и визуальные, а низкая хорошо освещенная расти-

тельность обеспечивает наилучшие условия для прекопуляционной коммуникации.

Для меромиз известно, что на стадии копуляции межвидовая изоляция обеспечивается за счет морфологических различий полового аппарата самцов (Яцук, Сафонкин, 2018). Мы предполагаем, что вибрационная коммуникация является важной частью видоспецифичного прекопуляционного поведения мух рода *Meromyza*. Возможно, зарегистрированный нами сигнал самок необходим самцам для продолжения ритуала ухаживания, или данные сигналы несут функцию сообщения самцу о готовности самки к копуляции.

С практической точки зрения, сигналы самок меромиз похожи между собой, что ограничивает возможности их использования в качестве маркера, определяющего видовую принадлежность исследуемых мух.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Лескова А.Я. Некоторые биологические особенности злаковой мухи меромизы – *Meromyza saltatrix* L. // Тр. Белорус. с.-х. академии. 1953. Т. 19. С. 44–53.
- Нарчук Э.П. Злаковые мухи (Diptera: Chloropidae), их система, эволюция и связь с растениями. Л.: Наука, 1987. 280 с.
- Пантелеева Н.Ю. Злаковые мухи (Diptera; Chloropidae) Центрального Черноземья (фауна, некоторые экологические особенности): Автореф. дис. канд. биол. наук. Л.: 1989. 20 с.
- Тишечкин Д.Ю., Веденина В.Ю. Акустические сигналы насекомых: репродуктивный барьер и таксономический признак // Зоол. журн. 2016. Т. 95. № 11. С. 1240–1276.
- Федосеева Л.И. К экологии злаковых мух *Meromyza* (Diptera, Chloropidae) в Московской области // Зоол. журн. 1961. Т. 40. № 8. С. 1205–1213.
- Шестаков Л.С. Сравнительный анализ вибрационных сигналов 16 видов клопов–щитников семейства Pentatomidae (Heteroptera) // Зоол. журн. 2015. Т. 94. № 3. С. 320–335.
- Яцук А.А., Сафонкин А.Ф. Закономерности изменения формы постгонитов мух рода *Meromyza* (Diptera: Chloropidae) // Журн. общей биологии. 2018. Т. 79. № 1. С. 18–27.
- Яцук А.А. Морфологическое и генетическое разнообразие злаковых мух рода *Meromyza* (Meigen, 1830) (Diptera, Chloropidae): Автореф. дис. канд. биол. наук. М.: 2019. 25 с.
- Arita L.H., Kaneshiro K.Y. Sexual selection and lek behavior in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) // Pacific Science. 1989. V. 43. № 2. P. 135–143. <http://doi.org/handle.net/10125/1210>
- Cocroft R.B., Rodriguez R.L. The behadoivioral ecology of insect vibrational communication // BioScience. 2005. V. 55. № 7. P. 323–334.
- Cokl A., Virant–Doberlet M. Communication with substrate–borne signals in small plant–dwelling insects // Annu. Rev. Entomol. 2003. V. 48. P. 29–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112605>
- Ge J., Wei J., Zhang D., Hu C., Zheng D., Kang L. Pea leafminer *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyziidae) uses vibrational duets for efficient sexual communication // Insect Science. 2019. V. 26. P. 510–522. <https://doi.org/10.1111/1744–7917.12598>
- Hernández M.V., Fabre C.C.G. The elaborate postural display of courting *Drosophila persimilis* flies produces substrate–borne vibratory signals // J. Insect. Behav. 2016. V. 29. P. 578–590. <https://doi.org/10.1007/s10905–016–9579–8>
- Hoy R.R., Hoikkala A., Kaneshiro K. Hawaiian courtship songs: evolutionary innovation in communication signals of *Drosophila* // Science. 1988. V. 240. № 4849. P. 217–219. <https://doi.org/10.1126/science.3127882>
- Hughes R.D. The influence of the prevailing weather on the numbers of *Meromyza variegata* Meigen (Diptera, Chloropidae) caught with a sweepnet // J. Anim. Ecol. 1955. V. 24. № 2. P. 324–335.
- Kanmiya K. Acoustic properties and geographic variation in the vibratory courtship signals of the european chloropid fly, *Lipara lucens* (Meigen) (Diptera, Chloropidae) // J. Ethology. 1990. V. 8. P. 105–119.
- Kanmiya K. Signals in Diptera // Insect sounds and communication / Eds Drosopoulos S., Claridge M. F.; New York: Taylor & Francis Group, 2006. P. 381–396.
- Kerwin P., von Philipsborn A.C. Copulation song in *Drosophila*: Do females sing to change male ejaculate allocation and incite postcopulatory mate choice? // BioEssays. 2020. V. 42. № 11. <https://doi.org/10.1002/bies.202000109>
- Mazzoni V., Anfora G., Virant–Doberlet M. Substrate vibrations during courtship in three *Drosophila* species // PLoS ONE. 2013. V. 8. № 11. P. e80708. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080708>
- Michelsen A., Fink F., Gogala M., Traue D. Plants as transmission channels for insect vibrational songs // Behav. Ecol. Sociobiol. 1982. V. 11. P. 269–281.
- Nishijima Y. Studies of the barley stem maggot, *Meromyza saltatrix* (Linné), with special reference to the ecological aspects // J. faculty agricult. Hokkaido univers. 1960. V. 51. Pt. 2. P. 382–449.
- Tishechkin D. Yu. Speciation in Macropsinae leafhoppers (Homoptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae) – the role of acoustic signal divergence and host plant shifts // Rus. Entomolog. J. 2015. V. 24. № 1. P. 7–16.
- Webb J.C., Calkins C.O., Chambers D.L., Schwienbacher W., Russ K. Acoustical aspects of behavior of Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*: analysis and identification of courtship sounds // Entom. Exper. Applicata. 1983. V. 33. № 1. P. 1–8.

## The First Data of Vibration Signals in Flies of the Genus *Meromyza* (Diptera, Chloropidae)

A. A. Yatsuk<sup>1, #</sup> and L. S. Shestakov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Leninskij prosp., 33, Moscow, 119071 Russia

<sup>2</sup> Institute for Information Transmission Problems RAS, Bolshoy Karetny per., 19, Moscow, 127051 Russia

#e-mail: sasha\_djedi@mail.ru

This paper discusses vibration communication in representatives of the genus *Meromyza*. The vibration signals frequency range of *Meromyza saltatrix* (L., 1761) females is 229 to 650 Hz with a pulse length of  $0.153 \pm 0.06$  s and the frequency range of *Meromyza femorata* (Macquart, 1835) females signals is 183 to 368 Hz with a pulse length of  $0.142 \pm 0.12$  s. The recorded *Meromyza* flies signals differ from the signals of flies from close genera and families.

**Keywords:** Chloropidae, *Meromyza*, precopulative behavior, vibrational communication