СОДЕРЖАНИЕ

Номер 6, 2021

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭВОЛЮЦИОННАЯ БИОЛОГИЯ

Изучение биологического покоя водных организмов в условиях открытого космоса и космического полета

В. Р. Алексеев 565

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

Антиоксиданты в стекловидном теле глаза плодов человека

И. Г. Панова, Ю. В. Сухова, А. С. Татиколов, П. П. Левин, Т. Ю. Иванец 588

БИОХИМИЯ

Различие содержания ионов в крови у кумжи *Salmo trutta* из двух близкорасположенных рек до смолтификации

Е. Д. Павлов, Е. В. Ганжа, Д. С. Павлов 594

ГЕНЕТИКА

Генетическая изменчивость и потенциальный ареал *Darevskia rostombekowi* в Закавказье

Ф. А. Осипов, А. А. Вергун, М. С. Аракелян, Р. К. Петросян, Н. Н. Дергунова, Л. А. Неймарк, В. Г. Петросян 602

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Влияние кадмия на антиоксидантный статус *in vitro* культур *Rhododendron japonicum*

Н. В. Загоскина, В. М. Катанская, Т. Н. Николаева 615

Морфологические, экологические, физиологические и биохимические особенности *Achillea* × *submicrantha* Tzvelev (Asteraceae) в сравнении с родительскими видами

В. Н. Нестеров, С. А. Сенатор, С. В. Саксонов, В. М. Васюков, Е. С. Богданова, О. А. Розенцвет 622

ЗООЛОГИЯ

Особенности паразитирования скребней *Polymorphus phippsi* (Palaeacanthocephala: Polymorphidae) в кишечнике птиц Баренцева моря

М. М. Куклина, В. В. Куклин 629

ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Сезонная динамика лизоцима у щуки *Esox lucius* L. Рыбинского водохранилища

М. Ф. Субботкин, Т. А. Субботкина 637

ЭКОЛОГИЯ

Оценка возможных трансформаций фитопланктона крупных рек восточной сибири в условиях глобального изменения климата

В. А. Габышев 644

Экология сибирской пеночки-теньковки *Phylloscopus collybita tristis* Blyth на северном пределе ареала

В. Н. Рыжановский 651

Анализ адаптационных возможностей репродуктивной системы рыжей полевки *Myodes glareolus,* обитающей на территориях природных геохимических аномалий

В. П. Мамина, Е. А. Малкова 660

Contents

No. 6, 2021

Theoretical and Evolutionary Biology

Study of Biological Dormancy of Aquatic Organisms in Open Space and Space Flight Conditions

V. R. Alekseev 565

Developmental Biology

Antioxidants in the Vitreous Body of Human Eye Fetuses

I. G. Panova, Yu. V. Sukhova, A. S. Tatikolov, P. P. Levin, and T. Yu. Ivanets 588

Biochemistry

Differences between Ion Level in the Blood of Brown Trout *Salmo trutta* from Two Close Located Rivers before Smoltification

E. D. Pavlov, E. V. Ganzha, and D. S. Pavlov 594

Genetics

Genetic Diversity and Potential Range of *Darevskia rostombekowi* in Transcaucasia

F. A. Osipov, A. A. Vergun, M. S. Arakelyan, R. K. Petrosyan, N. N. Dergunova, L. A. Neymark, and V. G. Petrosyan 602

Plant Physiology

Influence of Cadmium on Antioxidant Status *in vitro* Cultures of *Rhododendron japonicum*

N. V. Zagoskina, V. M. Katanskaya, and T. N. Nikolaeva 615

Morphological, Ecological, Physiological and Biochemical Features of *Achillea* × *submicrantha* Tzvelev (Asteraceae) Compared to Parental Species

V. N. Nesterov, S. A. Senator, S. V. Saxonov, V. M. Vasyukov, E. S. Bogdanova, and O. A. Rozentsvet 622

Zoology

The Peculiarities of Parasiting *Polymorphus phippsi* (Palaeacanthocephala: Polymorphidae) in the Intestines of Seabirds in the Barents Sea

M. M. Kuklina and V. V. Kuklin 629

Animal and Human Physiology

Seasonal Dynamics of Lysocyme in Pike *Esox lucius* L. of the Rybinsky Reservoir

M. F. Subbotkin and T. A. Subbotkina 637

Ecology

Assessment of Potential Phytoplankton Transformations of Large Rivers of Eastern Siberia in Response to Global Climate Change

V. A. Gabyshev 644

Ecology of the Siberian Chiffchaff *Phylloscopus collybita tristis* Blyth at the Northern Limit of the Range

V. N. Ryzhanovskiy 651

Analysis of the Adaptive Capabilities of the Reproductive System of the Bank Vole *Myodes glareolus*, Which Lives in the Territories of Natural Habitats Geochemical Anomales

V. P. Mamina and E. A. Malkova 660

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 6, с. 565–587

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭВОЛЮЦИОННАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 574.23:574.24:595.3

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПОКОЯ ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ В УСЛОВИЯХ ОТКРЫТОГО КОСМОСА И КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

© 2021 г. В. Р. Алексеев[@]

Зоологический институт РАН, С.-Петербург, 199034 Россия

[@]E-mail: alekseev@zin.ru

Поступила в редакцию 21.07.2020 г.
После доработки 18.09.2020 г.
Принята к публикации 18.09.2020 г.

В космическом пространстве ультрафиолетовое и космическое излучение, большой диапазон высоких и низких температур, измененная сила гравитации, электромагнитные поля, вакуум и их сочетание определяют повреждающее воздействие на живые организмы и выступают в качестве барьера для их межпланетного распространения. В то же время биологический покой, известный у широкого круга бактерий, грибов, животных и растений, позволяет сохранить жизнеспособность их покоящимся стадиям в экстремальных условиях в течение длительного времени. С 2005 по 2016 гг. на МКС наряду с низшими организмами были протестированы покоящиеся стадии (пропагулы) многоклеточных животных и растений для оценки их способности выживать после длительного воздействия условий открытого космоса и космического полета. Среди более чем 40 исследованных видов около трети составляли покоящиеся стадии водных организмов (икра карпозубых рыб, эмбрионы дафний, покоящиеся яйца листоногих раков, остракод, диапаузирующие личинки двукрылых насекомых). Эксперименты проводили в рамках четырех исследовательских программ: 1) внутри станции МКС (программа АКВАРИУМ) с ограниченным набором исследованных видов; 2) за пределами станции в космическом пространстве, но без воздействия ультрафиолетового излучения (программа BIORISK); 3) в модифицированных космических условиях, имитирующих поверхность Марса (программа EXPOSE-R); 4) в наземных экспериментах, в которых проведена лабораторная оценка воздействия космических факторов на покоящиеся стадии, а также изучение некоторых отдельно взятых факторов космического полета (например, нейтронного излучения). Были получены принципиально новые данные об устойчивости покоящихся стадий земных организмов к факторам космической среды, что изменило представления о возможности заноса земных форм жизни на другие планеты с космическими аппаратами и космонавтами.

Ключевые слова: диапауза, факторы космического полета, Международная космическая станция, межпланетный карантин, астробиология, гидробиология, микрогравитация, космическая радиация, ультрафиолет, магнитное поле, температурное воздействие, поиск внеземных форм жизни

DOI: 10.31857/S1026347021060032

Состояние биологического покоя, позволяющее особым стадиям (пропагулам, спорам, цистам) длительное время переносить условия, несовместимые с активной жизнедеятельностью, известны практически у всех исследованных в этом отношении организмов (Данилевский, 1961; Алексеев, 1990; Alekseev, Starobogatov, 1996). Было установлено, что обезвоженные покоящиеся стадии тардиград выживают после многомесячного нахождения в активной зоне атомного реактора, диапаузирующие яйца кладоцер и копепод сотни лет сохраняют жизнеспособность в лишенных кислорода седиментах озер (Katajisto, 1996), яйца суданского щитня переносят нагревание песка в пустынях свыше 100°C, сперма многих видов позвоночных животных и цисты артемий сохраняют активность после многолетнего хранения в жидком азоте (–196°C) (Алексеев, 1990; Алексеев, 2010; Ramirez-Reveco *et al.*, 2016; Wakayama *et al.*, 2017). В совокупности, описанные в литературе и известные из собственных экспериментов примеры высокой устойчивости пропагул водных организмов приближаются к условиям открытого космического пространства, что и позволило предложить их к экспериментам по нескольким программам на международной космической станции МКС (Alekseev *et al.*, 2007)

Биологический покой у организмов различной степени организации от бактерий до рыб (табл. 1) активно исследовали в экспериментальных условиях на МКС с 2005 по 2016 гг. как российские ученые (эксперименты АКВАРИУМ, BIORISK), так и совместно с исследовательскими группами ученых из Евросоюза и Японии (EXPOSE-R и

Таблица 1. Список видов водных организмов, участвовавших в российских экспериментах на МКС

	Вид	Программа	Состояние	Способность выживания в космосе
Низшие ракообразные	*Daphnia magna*	АКВАРИУМ, BIORISK-MSN, EXPOSE-R	Покоящиеся эмбрионы (зимние)	+
	Daphnia pulicaria	BIORISK-MSN	Покоящиеся эмбрионы (летние)	–
	Streptocephalus torvicornis	АКВАРИУМ, BIORISK-MSN, EXPOSE-R	Покоящиеся эмбрионы	+
	Artemia franciscana	EXPOSE-R	Покоящиеся эмбрионы	+
	Artemia salina	BIORISK-MSN	Покоящиеся эмбрионы	+
	Chirocephalus sp.	BIORISK-MSN	Покоящиеся эмбрионы (обводненные)	–
	Triops cancriformis	BIORISK-MSN	Покоящиеся эмбрионы	+
	Eucypris ornata	BIORISK-MSN, EXPOSE-R	Покоящиеся эмбрионы	+
Рыбы	*Nothobranchius guentheri*	BIORISK-MSN	Сухая икра	–
Насекомые	*Polypedilum vanderplanki*	BIORISK-MSN, EXPOSE-R	Криптобиот. личинки	+

EXPOSE-R2). Уделение особого внимания водным организмам было обусловлено как их большей эффективностью в рециклинге кислорода и других биогенных элементов в сравнении с наземной биотой (Шепелев, 1975), так и их повышенной защищенностью от повреждающих факторов среды (множественные протекторные оболочки, биохимические перестройки клеток при высыхании и промерзании, остановка эмбриогенеза на стадиях развития с неспециализированными клетками и т.д.) (Алексеев, 1990). Основные направления этих исследований на МКС были связаны с оценкой возможностей переноса земных форм жизни на другие планеты – межпланетарный карантин (Novikova *et al.*, 2014; Orlov *et al.*, 2017; Alekseev *et al.*, 2019), а также создания экологических систем обеспечения жизнедеятельности человека при межпланетных перелетах и создания внеземных поселений (Alekseev *et al.*, 2007; Baranov *et al.,* 2009).

В обзоре рассматриваются наиболее важные результаты, как опубликованные, так и доложенные автором на крупных международных и специализированных космических конференциях. Проведенными исследованиями и обзорными публикациями было очерчено довольно значительное поле новых знаний, в получении которых российские исследователи, прежде всего из научных учреждений РАН и Роскосмоса, сыграли ведущую роль.

Анализ полученных в экспериментах данных был проведен в обзоре по следующей схеме:

1) исследование воздействия факторов космического полета внутри космической станции (программа АКВАРИУМ);

2) исследование воздействия факторов космического полета открытого космоса, которое также разделяется на две группы по уровню соответствия внешним условиям:

– эксперименты BIORISK, в которых не учитывалось воздействие УФ солнечного излучения, но хорошо воспроизводились все остальные негативные факторы, включая температурные;

– эксперименты EXPOSE, позволившие оценить воздействие прямых солнечных лучей, но несколько смягчившие диапазон воздействующих температур.

Одновременно в каждом из разделов описывали результаты лабораторных оценок воздействия космических условий на исследованные организмы после их реактивации.

ОБЗОР ИССЛЕДОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ И МЕТОДОВ ИХ ИЗУЧЕНИЯ

По своему происхождению исследованные покоящиеся стадии можно разделить на три группы:

1. Собранные из естественных популяций:

– три вида ракообразных *Daphnia magna* (Straus, 1820) (Cladocera, Daphniidae)*, Streptoceph-*

alus torvicornis (Waga, 1842) (Anostraca, Streptocephalidae), *Eucypris ornata* (Müller, 1776) (Ostracoda, Cyprididae) и один вид одноклеточной водоросли *Pediastrum duplex* (Meyen, 1829) (Sphaeropleales, Hydrodictyaceae) из дафниевых прудов осетрового рыбоводного завода "Трудфронт" (Астраханская область, юг Европейской России, 46°00′ с.ш. 47°30′ в.д.). Материал прошел естественную терминацию на протяжении 8 месяцев в полотняных мешках, обеспечивающих хорошую сохранность, газообмен и следование сезонному ходу температуры и атмосферной влажности. Этот метод хранения принят в осетровом хозяйстве и обеспечивает высокий уровень реактивации всех исследованных организмов. Проведенные лабораторные испытания материала в мае 2005 г. показали высокий уровень реактивации, достигающий у некоторых видов (*D. magna*) 90% от числа исследованных эмбрионов. Покоящиеся стадии *D. magna* и *S. torvicornis* были использованы во всех космических экспериментах, как внутри станции, так и вне ее, периодически обновляясь накануне отправления в космос. Покоящиеся цисты водоросли были использованы при комплектации биологической части программы ФОБОС-ГРУНТ;

– цисты *Artemia salina* (L., 1758) (Anostraca, Artemiidae) собранные осенью 2004 г. на соленых озерах полуострова Крым (район курорта Саки, 45°07′ с.ш. 33°35′ в.д.); после дегидратации (до 40% от исходной массы) в соответствии с технологией длительного хранения цисты этого вида находились в емкости, предотвращающей дальнейшую потерю влаги, в морозильной камере холодильника при температуре –18°C. Использованы в экспериментах BIORISK и ФОБОС-ГРУНТ;

– *Chirocephalus* sp. (Anostraca, Chirocephalidae). Временные водоемы Словении близ Любляны. были использованы в экспериментах BIORISK.

2. Лабораторные культуры, длительное время поддерживаемые для проведения экспериментов:

– *Daphnia pulicaria (*Forbes, 1893) (Cladocera, Daphniidae), лабораторный клон, воспроизводящий покоящиеся стадии без самцов. Происхождение – коллекция Института лимнологии Макса Планка, г. Плоен, Германия;

– икра карпозубых рыб *Nothobranchius guentheri* (Pfeffer, 1893) (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae), полученная из аквариумной культуры этого вида, длительное время поддерживаемая в Зоологическом институте РАН, С-Петербург, Россия. Изначальное место происхождения – временные водоемы саванны Северной Африки;

– диапаузирующие личинки *Polypedilum vanderplanki* (Hinton, 1951) (Diptera, Chironomidae) из личной коллекции профессора Т. Окуда (Институт шелководства, Япония). Изначальное место происхождения – наскальные водоемы Северной Африки.

3. Покоящиеся стадии, происхождение которых точно не установлено (приобретены в зоологических магазинах):

– *Triops cancriformis* (Bosc, 1801) (Notostraca, Triopsidae). Приобретен в Японии. Использовали в экспериментах BIORISK;

– *Artemia franciscana (*Kellogg, 1906) (Anostraca, Artemiidae). Коммерческая партия, произведенная и герметично упакованная в США (г. Солт-Лейк-Сити) и приобретенная в С-Петербурге. Отличалась высоким процентом реактивации при контрольной оценке (87%). Использовали в экспериментах EXPOSE.

В лаборатории после наземной оценки их способности к реактивации покоящиеся стадии упаковывали особым образом в зависимости от эксперимента.

В эксперименте АКВАРИУМ сухие покоящиеся стадии размещали на клейкую прозрачную ленту, установленную в виде специальных окон в картонных блоках, с двух сторон закрывали защитным листом бумаги и помещали в пластиковые герметично закупоренные пакеты. Каждый вид помещали в картонные блоки с тремя окошками (каждое площадью 1 дюйм^2), содержащими наклеенные стадии. Для каждого вида было приготовлено не менее пяти блоков, которые затем были случайным образом разделены на пять групп: 1) для экспонирования на МКС в течение 1 месяца; 2) для экспонирования на МКС в течение 8 месяцев; 3) для лабораторного контроля, содержащегося в условиях сходных по температуре и влажности с таковыми на борту МКС; 4) для лабораторного контроля, соответствующего плохим условиям хранения (18–24°C, переменная влажность 75–95%, естественный ход освещения для широты 60° в период с июня по октябрь) и 5) для лабораторного контроля, соответствующего оптимуму по хранению (4°C, влажность 60%, темнота). Количество покоящихся эмбрионов в каждом из вариантов в целом зависело от размеров покоящихся стадий и составляло у дафний не менее 30 эмбрионов на вариант (42, в среднем), а у артемий не менее 500 (720, в среднем).

Для эксперимента BIORISK сухие покоящиеся стадии водных организмов помещали в воздухопроницаемые полотняные мешочки, а те, в свою очередь, – в пластиковые чашки Петри, плотно заклеенные по окружности, но имеющие в центре крышки отверстие для выхода воздуха, на которое также приклеивали бактериальный фильтр с размером пор 0.5 мкм. Количество покоящихся стадий зависело от их размера и составляло для икры рыб – 50, для эфиппиев дафний и яиц стрептацефалов – 250–300, а для цист артемий – 10–12 тыс.

В экспериментах EXPOSE покоящиеся стадии помещали в пластиковые пакеты размером 7 × 7 мм и 10 × 10 мм. Количество эмбрионов составляло

для дафний – 90–100, для артемий и щитня – не менее 1000. Пластиковые пакеты в земных условиях освобождали от избытка воздуха и герметично запаивали.

Основным методом оценки негативных эффектов космического полета была реактивация диапаузирующих стадий (реактивацию оценивали по количеству вылупившихся жизнеспособных особей). Использованные схемы реактивации зависели от требований биологии вида:

1) реактивация пресноводных видов беспозвоночных: дафнии, *Eucypris ornata*, *S. torvicornis*, *Chirocephalus* sp. Покоящиеся яйца каждого вида подсчитывали в каждом образце, после чего их переносили из пластиковых пакетов в чашки Петри объемом 10 мл, заливали аэрированной в течение 1 ч охлажденной водой (10–12°C) и помещали на двое суток в темную комнату с температурой 10°C для обводнения эмбрионов и синхронизации эмбрионального развития. После этой предварительной подготовки эмбрионы переносили в термостат с изменяющейся температурой (14–16°C в темновой фазе и 24–26°C в световой) и фотопериодом долгого дня (14 : 10). Это имитировало естественный световой и температурный режим весны – наиболее активной части сезона для реактивации эмбрионов. Чашки Петри проверяли дважды в день и всех реактивированных животных отбирали, снимали под микроскопом цифровой камерой, а затем использовали для экспериментов по выращиванию или для взвешивания на весах Сарториус с разрешением 0.0001 мг новорожденных, для чего их высушивали (при 60°C в течение 24 ч) до постоянного веса. Тестирование реактивации продолжалось не менее 3 дней после появления последнего новорожденного (обычно через 2–4 недели). Покоящиеся яйца в той же посуде затем возвращали в холодное (10°C) и темное помещение на 2 недели. После холодной обработки повторяли тот же цикл реактивации, и общее время реактивации составляло не менее одного месяца. Скорость реактивации (количество молоди, вылупившейся в данный день) и общее количество вылупившихся новорожденных за весь период наблюдения были рассчитаны, исходя из общего количества эмбрионов или покоящихся стадий в 8–16 повторностях. Эти показатели в эксперименте затем сравнивали с аналогичными данными в контроле со статистической оценкой достоверности различий.

2) для реактивации артемий была использована среда с содержанием 15‰ NaCl при 25°C и фотопериоде 14:10. Оценка реактивации начиналась уже на следующий день. Общая продолжительность наблюдений составляла не менее 1 месяца.

3) при реактивации икры рыб икринки помещали в небольшие стеклянные аквариумы объемом 0.5 л, заполненные подогретой дождевой водой, и выдерживали в термостате при 25°C. Начало эмбрионального развития отслеживали с помощью бинокулярного микроскопа МБС-9 дважды в сутки на протяжении месяца.

Размер выборки при реактивации составлял для крупных эмбрионов (дафнии, *S. torvicornis*, *Chirocephalus* sp., *Eucypris ornata*, *N. guentheri* и *P. vanderplanki*) не менее 30 , а для мелких (артемии) – не менее 200 в каждых из вариантов.

В ряде экспериментов эффект факторов космического полета оценивали также на показателях жизненного цикла потомства, выведенного от экспонированных на МКС эмбрионов двух поколений. Эти эксперименты проводили на базе Института лимнологии Макса Планка, в котором контролировали температурные, газовые и пищевые условия.

Дафнии и жаброноги культивировали группами по 4–6 особей в проточных сосудах объемом 250 мл (Lampert *et al.,* 1988) при скорости потока воды, содержащей взвешенные водоросли, 1 л/сут в условиях постоянного питания и фотопериода при температуре 25°C. Ракообразных кормили зеленой водорослью *Scenedesmus obliquus* (линия SAG 276-3a, коллекция водорослей Goettingen), выращенной в хемостате с модифицированной средой CHU-12 (Muller, 1972) с постоянной скоростью 0.7 л/сут для поддержания одинакового качества пищи на протяжении всех экспериментов.

Эксперимент по выращиванию начинался с помещения новорожденных в условия высокой пищевой концентрации (1 мг C/л) с длинными фотопериодами (14 ч света) и короткими фотопериодами (10 ч света). Пищевую среду обновляли каждое утро, а животных проверяли дважды в день. После того как самки отложили свою первую кладку, было зарегистрировано время, подсчитано число новорожденных (размер первой кладки) и определена средняя сухая масса новорожденных. Самок культивировали в этих условиях до тех пор, пока они не откладывали вторую кладку яиц в выводковую сумку, затем их высушивали и взвешивали. Для расчета соматического роста использовали массу новорожденного и конечную массу самки. Несколько самок из контрольной группы и группы, подвергшейся воздействию факторов МКС, были использованы для получения третьей кладки, из которой новорожденных затем выращивали в тех же условиях, в которых их матери откладывали яйца. После созревания у них определяли пол, размер и сухую массу. Данные первоначально оценивались на нормальность распределения, а затем для оценки достоверности различий в зависимости от типа распределения использовались либо *t*-test, либо непараметрические индексы (Mann–Whitney test). Дисперсионный анализ результатов проводился с применением процедуры ANOVA. Оценка статистических параметров

полученных результатов производилась на основе компьютерной программы Statistica-6.

Следует указать, что эксперименты BIORISK и EXPOSE оценивались только по параметрам реактивации. Сопоставление различных, использованных в эксперименте параметров жизненного цикла (количество новорожденной молоди, сухой вес самок, начало первого размножения и т.п.) показало, что реактивация является наиболее удобным и информативным индикатором негативного воздействия факторов космического полета на покоящиеся стадии водных организмов. Наряду с тем, что воспроизвести условия культивирования, аналогичные лаборатории Института лимнологии Макса Планка (проточные культуры со строго контролируемой калорийностью пищи) не представлялось возможным, реактивация покоящихся стадий оказалась оптимальным для исследования параметром и была использована для всех последующих экспериментов BIORISK и EXPOSE.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ВНУТРИКОРАБЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА (ЭКСПЕРИМЕНТ АКВАРИУМ)

Эксперимент АКВАРИУМ – длительная экспозиция обезвоженных стадий покоя ракообразных внутри космической станции, – стал первым исследованием по оценке влияния факторов космического полета на протекание диапаузы и параметры жизненного цикла при культивировании в земных условиях животных организмов (Alekseev, Sychev 2006; Сычев и др., 2007). Это исследование было проведено с целью разработки новой технологии создания и транспортировки искусственной водной экосистемы для использования вне биосферы Земли (Alekseev *et al.*, 2007). Поддержание жизнеспособности стадий покоя водных животных и растений в космических условиях должно стать важной частью такой биотехнологии. Исследовались реактивация эмбрионов и параметры жизненных цикла у двух видов ракообразных – *Daphnia magna* и *Streptocephalus torvicornis* – во время космического полета после 1, и 8-мес. экспозиции их высушенных покоящихся яиц в российском сегменте МКС. В служебном модуле МКС конверты с покоящимися стадиями помещались в прободержатель установки “Растения-2” в контролируемом световом, радиационном и температурном режимах вблизи микротеплицы “Лада” (рис. 1).

После 30 дней пребывания на орбите образцы первой группы были доставлены обратно на Землю и параллельно с контрольными образцами в течение трех дней доставлены в Лабораторию экологической физиологии Института лимнологии им. Макса Планка (Плоен, Германия) для детального анализа реактивации и продуктивного потенциала этих двух видов. Все образцы находились в герметично упакованных полиэтиленовых пакетах, что исключало их обводнение за счет атмосферной влаги.

Оценка реактивации и параметров жизненного цикла *Daphnia magna* после космического полета. Выход молоди *D. magna* из обработанных на МКС эфиппиев и из контрольной группы начался одновременно, на третий день после их перемещения с 10 на 25°C (пятый день после начала активации) и на пятый день (седьмой день после начала активации) для эмбрионов, содержавшихся в заведомо неблагоприятных условиях (рис. 2). Средние показатели реактивации составили 39.6% у экспонированных на МКС эмбрионов и достоверно выше (51.8%) в контрольной группе при расчете на основе числа эфиппиев (Alekseev *et al.*, 2019). Помимо различий в уровне реактивации и продолжительности этого процесса, испытуемые группы также различались по динамике сухой массы новорожденных (рис. 3). В контрольной группе (наземной) сухая масса новорожденных в начале периода вылупления (1–3 дни) была достоверно ниже, чем в середине процесса (4–5 дни). У экспонировавшихся на МКС эмбрионов обнаружилась противоположная динамика сухой массы новорожденных. Фактически, в контрольной группе первыми вылупились новорожденные с низкой сухой массой, т.е. более слабые (0.0046 ± 0.00047 мг), тогда как в группе, экспонировавшейся на МКС, первыми появлялись самые крупные эмбрионы (массой 0.0056 ± 0.00034 мг) – самые сильные. В середине периода вылупления в контрольной группе были обнаружены более крупные новорожденные особи (массой 0.0061 ± 0.000418 мг), чем в группе, экспонированной на МКС (массой 0.0047 ± 0.000579 мг) (Alekseev *et al.*, 2019). По-видимому, на МКС эмбрионы *D. magna* были подвержены воздействию негативного фактора или набора факторов, которые подавляли их жизненные способности (своего рода стресс, вызванный космическим полетом), поэтому самые слабые эмбрионы с меньшим весом не могли вылупиться первыми, и их место в группе МКС было занято крупными новорожденными, которые, возможно, также имели подавленную, но все еще достаточную жизненную способность вылупляться из своих оболочек.

При оценке воздействия факторов космического полета на параметры жизненного цикла *D. magna* (время выхода первой кладки, выживаемость до созревания, размер первой кладки, масса новорожденных первой кладки, сухая масса самок в возрасте выхода второй кладки, возможное влияние матери на пол у потомства) был обнаружен значительный эффект от пребывания покоящихся яиц в сухом состоянии на МКС на два из этих параметров (табл. 2). Размер первой кладки у са-

Рис. 1. Программа АКВАРИУМ. а – Искусственный пруд для выращивания дафний, откуда брался материал; б – картонные блоки с покоящимися эмбрионами, помещенные в герметичные пластиковые пакеты; в – прободержатель размещен рядом с блоком “Растения” (положение показывает стрелка); г – культивирование дафний в Институте лимнологии Макса Планка (Германия).

мок, рожденных от экспонированных на МКС эмбрионов (11.14 ± 3.592 яйца на особь), был достоверно меньше, чем в контрольной группе (14.39 ± 2.847 яйца на особь). Небольшое, но также значимое различие было обнаружено для времени созревания, которое было больше у самок, полученных из эмбрионов, подвергшихся воздействию факторов МКС (10.31 ± 0.372 сут), чем у контрольных животных (9.95 ± 0.284 сут) (Алексеев и др., 2011). Оба эти параметра очень важны для динамики популяции дафний (Lynch, 1980). Они в основном отвечают за приспособленность популяции или клонов к условиям окружающей среды, а также играют ключевую роль в их продуктивности, как в условиях культуры, так и в природе (Ebert, 1993). Не было обнаружено различий между группами с МКС и контрольной группой с точки зрения выживания до созревания, массы новорожденных и массы самок (Alekseev *et al.*, 2019).

Для оценки гипотезы о более низкой жизненной способности у эмбрионов *D. magna*, подвергшихся воздействию факторов МКС (по сравнению с контрольными эмбрионами) была исследована резистентность эмбрионов *D. magna*, экспонированных в космосе, (параллельно с кон-

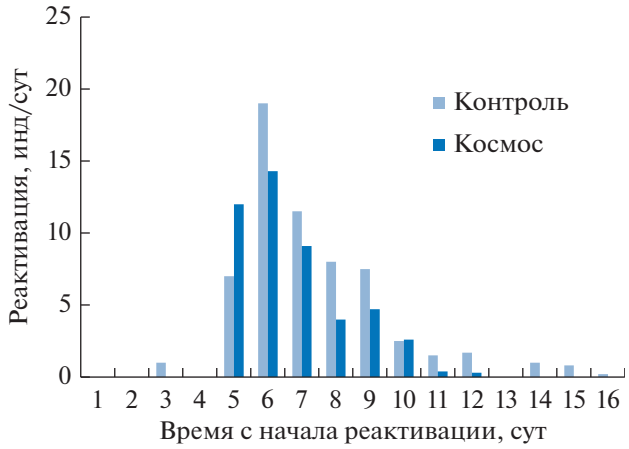


Рис. 2. Реактивация *Daphnia magna* в контроле и после полета.

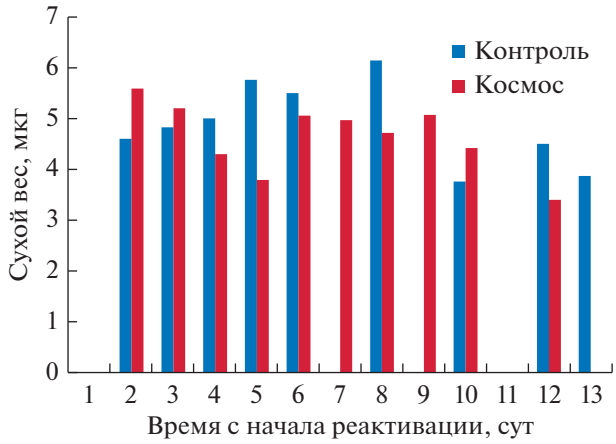


Рис. 3. Сухой вес новорожденных дафний после полета и в контроле.

тролем) к инвазии грибкового паразита *Pythium daphnidarum* Petersen, 1910 (рис. 4). В качестве референтной внешней группы использовались эмбрионы *D. magna* с искусственно подавленным уровнем реактивации (т.е. сниженным процентом реактивированных эмбрионов в контрольных образцах). Эту контрольную группу содержали в неблагоприятных условиях (при высокой температуре, при постоянном освещении и сухом воздухе) в течение 6 мес. Для характеристики резистентности к паразиту использовались два параметра:

1) интенсивность заражения, рассчитываемая как число яиц, зараженных паразитом, выраженное в процентах; и 2) распространение инвазии, рассчитываемое как число повторностей, в которых наблюдалось заражение паразитом, выраженное в процентах (рис. 5). Две группы эмбрионов *D. magna*, подвергшихся воздействию экспонирования на орбите показали более высокую чувствительность к инвазии паразитов, чем эмбрионы из контрольной группы. Наименьшая резистентность обнаружена у эмбрионов с пониженной скоростью реактивации, вызванной неблагоприятными условиями хранения на Земле. Что касается интенсивности заражения, образцы, подвергшиеся воздействию факторов МКС, были ближе, чем контрольные образцы, к эмбрионам с подавленной скоростью реактивации. Устойчивость эмбрионов *D. magna* к инвазии паразитами была в 1.43 раза ниже в группе, экспонировавшейся на МКС, чем в контроле, что возможно, соответствует уровню снижения жизненной способности эмбрионов, вызванной космическим фактором (Alekseev *et al.*, 2019).

Были прослежены рост и развитие потомства (третьей кладки) самок *D. magna* из покоящихся яиц, подвергнутых воздействию космического полета, в сравнении с содержавшимися в лабораторных условиях в виде диапаузирующих эмбрионов. Обнаружилось радикальное различие в половой принадлежности у этих потомков между группой МКС и контролем. Все пять повторностей от потомства самок, подвергшихся воздействию факторов МКС, содержали высокую долю самцов от 30 до 78% (в среднем, 54.9 ± 25.94%) (рис. 6). Среди потомства

Таблица 2. Средние величины (μ) и стандартное отклонение (σ) параметров жизненного цикла у особей полученных от эмбрионов *D. magna* экспонированных на МКС и содержащихся в лаборатории (Алексеев и др., 2011)

	Контроль				МКС			
	эксперимент I		эксперимент II		эксперимент I		эксперимент II	
	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ
Сухая масса самок, мг	0.3837	0.0254	0.3366	0.0280	0.3918	0.0635	0.2549	0.0512
Длина самок, мм	3.0937	0.1364	3.1307	0.1605	3.4970	0.1593	3.0560	0.0919
Общий размер первой кладки у 5 самок, шт.	67.20	16.08	70.00	10.22	49.00	17.47	56.00	16.57
Сухая масса новорожд., мг	0.0073	0.0005	0.0073	0.0006	0.0084	0.0016	0.0063	0.0006
Выживание, %	96.00	8.94	96.00	8.94	90.00	11.55	100.00	0.00
Время созревания, сут	9.80	0.27	10.10	0.22	10.63	0.25	10.00	0.00

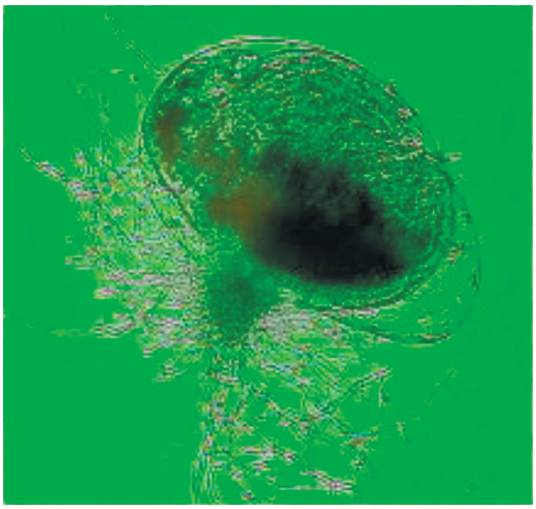


Рис. 4. Паразитический гриб *Pythium daphnidarum*, поразивший экспонировавшийся на МКС эмбрион *Daphnia magna*.

контрольной группы, выращенного в тех же условиях, не появилось ни одного самца (Alekseev *et al.*, 2019).

Известно, что переход от партеногенеза к бисексуальному размножению, особенно у дафний, является реакцией на стрессовые факторы окружающей среды различного происхождения, такие как снижение доступности пищи, изменения фотопериода и сигнальных метаболитов, резкие колебания температуры (Glazier, 1992). В описанных выше экспериментах условия культивирования, используемые для групп с МКС и контрольных, были эквивалентными, стабильными и благоприятными для партеногенеза в течение, по меньшей мере, двух последующих поколений. Единственное отчетливо видимое различие между ними состояло в условиях нахождения диапаузирующих эмбрионов, экспонированных на МКС в течение 1 мес. Очевидно, что даже один месяц нахождения в условиях орбитальной станции был воспринят сухими диапаузирующими эмбрионами как сигнал стресса, и эта информация затем была передана посредством материнского эффекта их потомству, как было показано в отношении фотопериода и другой биологической информации у многих беспозвоночных, включая дафний (Mousseau, Fox, 1998; Alekseev, Lampert, 2001). Это дает вполне определенное основание утверждать, что стресс окружающей среды, испытываемый на космической станции, также может быть причиной других выявленных различий между группами, получившими воздействие факторов МКС, и контрольными группами, которые были обнаружены в вышеописанных экспериментах по реактивации, устойчивости к паразитам и анализу жизненного цикла *D. magna*.

Оценка реактивации и параметров жизненного цикла *Streptocephalus torvicornis* после космического полета. Вылупление *S. torvicornis* из экспонированных на МКС и контрольных яиц началось одновременно на следующий день после их перемещения в температурные условия 25°C (четвертый день от начала обводнения) (рис. 7). Отчетливая разница в общей продолжительности вылупления между этими вариантами (3 дня у экспонированных на МКС яиц против 9 дней у контрольных яиц) также сопровождалась значительной разницей в их общей скорости реактивации. Как и в случае *D. magna*, в экспонированных на МКС яйцах *S. tor-*

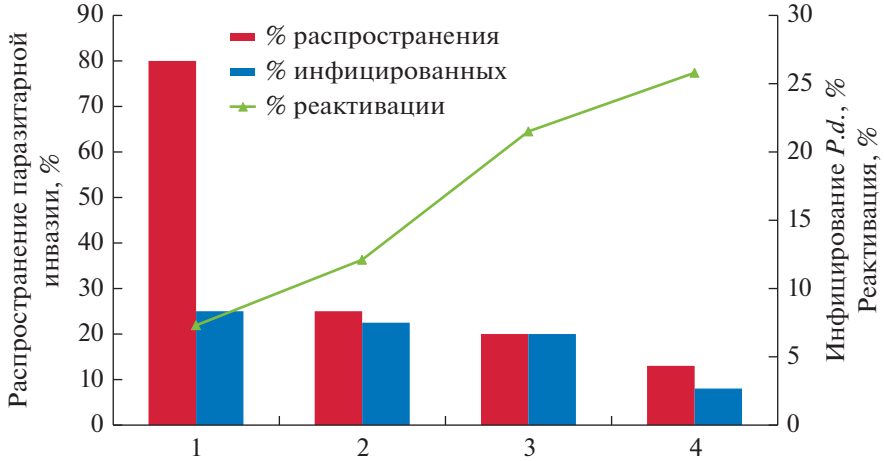


Рис. 5. Инфицирование покоящихся эмбрионов *Daphnia magna* паразитическим грибом *Pythium daphnidarum*. 1 – эмбрионы с подавленной скоростью реактивации; 2 – первая группа из космоса; 3 – вторая группа из космоса; 4 – контрольная группа. Красные столбцы обозначают процент распространения паразита (количество экспериментов с *P. daphnidarum*), синие столбцы обозначают процент заражения паразитом, а зеленая сплошная линия обозначает процент реактивации.

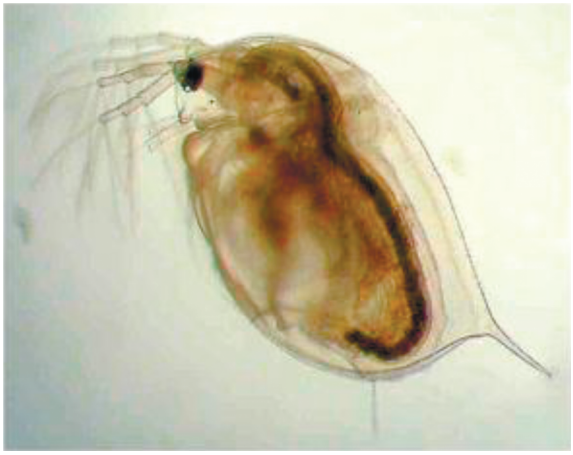


Рис. 6. Самец *Daphnia magna*, появившийся в потомстве дафний после космического полета.

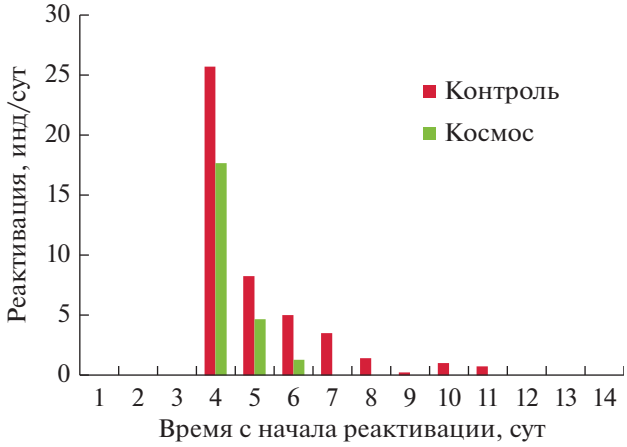


Рис. 7. Реактивация *Streptocephalus torvicornis* в контроле и после полета.

vicornis реактивация была значительно меньше (всего около половины от контроля), чем в контрольных яйцах (Alekseev *et al.,* 2019). Яйца этого вида, содержавшиеся в неблагоприятных условиях на земле, обладали эффективностью реактивации, близкой к нулю.

S. torvicornis, выращенный из яиц, собранных в пруду, характеризуется очень высоким уровнем изменчивости в своем жизненном цикле, в связи с чем было обнаружено лишь несколько существенных различий в параметрах между образцами этого вида, подвергнутых космическому воздействию, и контролем (табл. 3). Единственным значимым эффектом, обнаруженным при анализе жизненного цикла *S. torvicornis*, стало влияние длины дня (фотопериода) на размер животных в возрасте 12 дней (время появления яиц в выводковом мешке самки). Размер животных различался между длинным днем (9.838 ± 1.1546 мм) и коротким днем (8.676 ± 1.9123 мм) в обоих вариантах, но был несколько меньше при условии экспозиции яиц на МКС (Алексеев и др., 2011). Другие параметры, такие как длина самки/самца или размер кладки, также показали различия между результатами экспериментов в условиях длинного/короткого дня и в условиях МКС/контроля, но огромные популяционные полиморфизмы приводят к большим стандартным отклонениям и маскируют эти различия, лишая их достоверности.

Исследование стресс-сигналов и негативного воздействия отдельных внутрикорабельных факторов космического полета на покоящиеся стадии ракообразных в условиях земной лаборатории

Возможными негативными факторами окружающей среды при космическом полете на МКС, влияющими на биологические объекты, принято считать: невесомость (микрогравитацию), модифицированный газовый состав (например, повышенная доля этилена), космическую и индуцированную ею нейтронную радиацию, техногенные

Таблица 3. Средние величины (μ) и стандартное отклонение (σ) параметров жизненного цикла у особей полученных от эмбрионов *S. torvicornis* экспонированных на МКС и содержащихся в лаборатории (Алексеев и др., 2011)

	Контроль				МКС			
	длинный день		короткий день		длинный день		короткий день	
	μ	σ	μ	σ	μ	σ	M	σ
Средняя длина в возрасте 12 сут, мм	9.93	1.52	8.71	2.90	9.77	0.96	8.64	0.34
Длина самок в 12 сут, мм	10.41	1.20	9.48	3.76	10.32	1.40	9.89	0.67
Длина самцов в 12 сут, мм	8.73	0.10	8.23	2.88	9.56	1.17	8.67	0.41
Кладка I (цист на особь)	3.25	3.32	8.88	11.68	2.50	1.87	11.04	12.04
Производство яиц за 3 недели (цист на особь)	9.12	5.38	8.88	11.36	11.80	6.29	14.04	10.43
Выживание, %	85.00	19.15	100.00	0.00	84.00	16.73	85.00	19.15
Время созревания, сут	16.50	1.00	17.25	1.50	15.60	1.67	16.00	0.00

Таблица 4. Характеристика окружающей среды экспериментов с покоящимися стадиями на МКС (по данным Thirsk *et al.*, 2009 – a; Rettberg *et al.*, 2004 – b; Matthia *et al.*, 2017 – c; Novikova *et al.*, 2014 – d; Rabbow *et al.*, 2015 – e; Zhou *et al.*, 2007 – f; Dachev *et al.*, 2012, Berger *et al.*, 2012 – g; Dachev *et al.*, 2015, Berger *et al.*, 2015 – h; NASA Mars Radiation Environment briefing, 2017 – i; Berces *et al.*, 2013 – j; Mo *et al.*, 2014 – k)

	Околоземная орбита			Поверхность Марса (b, c, i, k)
	внутри МКС	снаружи МКС		
Эксперимент	АКВАРИУМ	BIORISK-MSN	EXPOSE-R (IMBP)	
Продолжительность экспозиции, сут.	30 и 240	405–935 (d)	682 (e)	
Температура, °C	+17...+28 (a)	–100...+100 (a,d)	–24...+49 (e)	–123...+25
Давление, Па	10^5 (земное) (a)	10^{-5} (вакуум) (d, e)		~560
Гравитация	~1 μ*g* (микрогравитация) (a)			0.38 *g*
Магнитное поле, μT	~40 (k)			<5
Воздействие UV-B и UV-C излучения	Отсутствует, прободержатель светонепроницаем	Отсутствует, контейнер светонепроницаем (d)	Присутствует, 2687 ч (100% прохождение λ > 170 nm) (e, j)	Присутствует (λ > 200 nm)
Средняя доза космической радиации в сут., μGy/day	180–360 (f)	320–408 (g)	323–381 (h)	200–300

электромагнитные поля, радио- и СВЧ-излучение, механическую вибрацию, включая ультразвук, скелетный ритм освещенности и спектрального состава света, обусловленный быстрым обращением станции вокруг Земли. Кроме этого, в начале полета и при приземлении на объекты краткосрочно воздействуют значительные перегрузки и шум от работы двигателей. Совокупное влияние этих элементов искусственной среды называется фактором космического полета (ФКП), соотносительная роль отдельных элементов которого в возникающих эффектах у биообъектов представляет большой интерес, как для науки, так и для практики космических полетов. При изучении воздействия ФКП на выживание покоящихся стадий модельного вида ракообразных (*Daphnia magna*) и параметры его жизненного цикла после реактивации и культивирования влияние отдельных факторов исследовалось также в земных условиях. При этом было принято, что невесомость (микрогравитация) не должна значительно влиять на водные организмы, которые в земных условиях при плотности тела равной воде обитают в планктоне и почти не имеют веса. В наземных условиях микрогравитация воспроизводилась (Trotter *et al.*, 2015), и заметных воздействий на организм обнаружено не было. Второй важный фактор – состав газовой смеси на МКС, – также должен быть мало значим для диапаузирующих герметично упакованных эмбрионов, уровень дыхания которых при инструментальном контроле не отличим от нуля (Alekseev, Starobogatov, 1996).

В итоге были проведены наземные однофакторные эксперименты по выявлению четырех важнейших на наш взгляд компонентов космического полета на реактивацию диапаузирующих эмбрионов модельного вида ракообразных *D. magna*. Эти компоненты включали (табл. 4): измененное магнитное поле Земли и электромагнитные поля приборов и двигателей; ультразвук; СВЧ излучение; нейтронную радиацию, по типу и интенсивности эквивалентную таковой на МКС.

Воздействие отдельных факторов космического полета проводилось в наземных экспериментах с сухими эмбрионами *D. magna*. Главным оцениваемым параметром в этих экспериментах было определение уровня и темпа реактивации после длительного (до 1 мес.) воздействия отдельных факторов в сравнении с контролем. Эксперименты проводили при температуре 22–24°C (средняя температура на МКС (Thirsk *et al.*, 2009)).

Магнитное поле. Для оценки воздействия измененного магнитного поля Земли в экспериментальной установке Института геомагнетизма РАН (поселок Борок Ярославской обл.) покоящиеся стадии *D. magna* в течение 15 дней экспонировали в трех опытных вариантах и в контроле: 1 – отсутствие магнитного поля, 2 – удвоенное по напряжению магнитное поле Земли, 3 – переменное электромагнитное поле, имитирующее работу электротехнических приборов МКС. Контролем служили покоящиеся стадии *D. magna*, подвергающиеся естественному фону магнитного поля Земли в июне 2008 г. Каждый из экспериментальных вариантов проводили в трех повторностях, включавших не менее 50 эфиппиев данного вида. После окончания экспозиции покоящиеся яйца *D. magna* были реактивированы в соответствии с

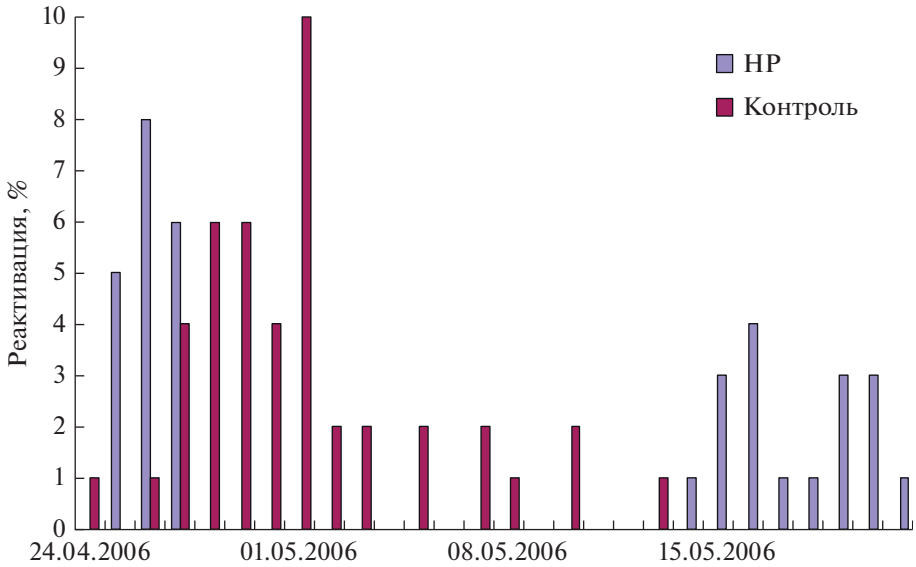


Рис. 8. Воздействие нейтронной радиации на вылупление покоящихся стадий *D. magna*.

вышеуказанным протоколом, а результаты реактивации были сопоставлены с использованием статистического пакета Statistica 6 (Alekseev, Sychev, 2006; Alekseev *et al.*, 2009). Несмотря на некоторые вариации между результатами экспериментов, статистически достоверных различий не было установлено. Это позволяет исключить данный фактор космического полета из числа влияющих на космические эксперименты по экспонированию покоящихся стадий ракообразных.

Техногенные факторы космического полета: ультразвук и СВЧ. Шум (вибрация), радиоволны и высокочастотные излучения, связанные с работой механизмов и электротехнических устройств МКС, также следует отнести к возможным факторам, восприятию которых не препятствует изоляция покоящихся стадий в пластиковых пакетах. Из числа данных факторов были выбраны два энергетически наиболее сильных: ультразвук и СВЧ-излучение (Alekseev, Sychev, 2006; Alekseev et al., 2009). Было установлено, что даже длительное воздействие указанных факторов в рамках, обусловленных техническими характеристиками МКС, не оказывали заметного воздействия на реактивацию эмбрионов *D. magna*, в сравнении с контролем, однако уже двукратное превышение установленных технических нормативов по ультразвуку и СВЧ приводило к статистически достоверному снижению процента реактивированных эмбрионов. Дальнейшее повышение этих параметров, в особенности СВЧ-излучения, существенно влияло на выживание, приводя к гибели эмбрионов. Таким образом, техногенные факторы МКС в случае их даже непродолжительного возрастания в сравнении с нормативами способны снизить выживание покоящихся стадий ракообразных, что необходимо учитывать при планировании условий перевозки элементов экологической системы жизнеобеспечения при долгосрочных полетах и создании искусственных экосистем на других планетах.

Нейтронная радиация. Воссоздать космическую (корпускулярную) радиацию в наземных экспериментах весьма сложно. Для этого требуется экспериментальный разгон элементарных частиц в синхрофазотронах (коллайдере), что очень дорого. Обычно для воссоздания радиационной обстановки на МКС используют эквивалентное нейтронное излучение с помощью цезиевых изотопов. Данный подход был использован в эксперименте с оценкой воздействия этого фактора на реактивацию эмбрионов *D. magna*, который проводили на базе Института медико-биологических проблем РАН (Alekseev, Sychev, 2006; Alekseev *et al.*, 2009). Имитацию космического излучения проводили на нейтронном радиоактивном источнике низкой энергии, аналогичном значению энергии внутри МКС (около 200 мкГр), в течение 1 мес. Реактивация экспонированных эмбрионов делилась на два этапа (рис. 8). На первом этапе реактивация была близка к показателям группы с МКС (первые 2 недели), а через 2 недели началась отложенная реактивация второй группы эфиппиев. Вероятно, воздействие радиации как стрессового сигнала вызвало заметную задержку реактивации у одной части популяции дафний. Как показали последующие исследования, эти две части популяции принадлежали к разным клонам (Abramson, Alekseev, 2009).

Заключение экспериментов на МКС. Для завершения этой части работы можно сформулировать следующие краткие обобщения:

1) эксперименты на космической станции МКС впервые показали, что обезвоженные диапаузирующие эмбрионы *D. magna* могут быть чувствительны к некоторым факторам окружающей среды, и эту стресс информацию через материнский эффект они передают уже следующему поколению, вызывая усиленное формирование самцов при благоприятных условиях культивирования. Подобная чувствительность, обнаруженная у неспециализированных клеток диапаузирующего эмбриона (гаструлы) представляет интерес для экологии не только экспонируемых в космосе ракообразных, но и для изучения находящихся в неблагоприятных земных условиях, что открывает новое направление исследований и явно требует тщательного изучения.

2) обнаружение аналогичных реакций у покоящихся стадий (пропагул) других животных или растений может иметь большое значение для транспортировки элементов искусственных экосистем во время длительных космических полетов и последующего культивирования на планетных станциях вне Земли.

3) из исследованных факторов космического полета наиболее глубокое стресс-влияние на живые системы (возможно, включая людей) оказывает слабое вторичное нейтронное излучение, которое не снижает выживаемость эмбрионов, но кардинальным образом меняет темп их реактивации, замедляя или откладывая выход из яиц слабых, и/или более чувствительных к радиационному состоянию среды организмов.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ВНЕКОРАБЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

Межпланетарный карантин (программа BIORISK). Защита планет от заноса иных форм жизни – одна из ключевых проблем освоения дальнего космоса человечеством. Крайне важно оценить риски, связанные с возможным переносом биологического материала через межпланетное пространство в ходе космических исследований.

Оборудование BIORISK было разработано в Институте медико-биологических проблем РАН (ИМБП) для проведения космических экспериментов по длительному воздействию условий открытого космоса на покоящиеся стадии прежде всего низших организмов (бактерий и грибов), как неизбежных спутников пилотируемой космонавтики (Novikova *et al.,* 2014). Устройство BIORISK-MSN состояло из трех металлических контейнеров, в которые помещали 24 пластиковые чашки Петри диаметром 65 мм с исследуемыми организмами внутри (рис. 9). Каждая чашка содержала бактериальный фильтр, проницаемый для воздуха, но не для микроорганизмов. Контейнеры крепили на специальной платформе на внешней стороне МКС (рис. 10). Доставленные на МКС герметично закрытыми, эти контейнеры открывались космонавтом непосредственно перед закреплением на корпусе станции.

В первом эксперименте BIORISK, который был начат в январе 2005 г., испытуемыми организмами были прокариоты (*Bacillus*) и эукариоты (грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus* и *Cladosporium*) (Novikova *et al.*, 2011). Продолжительность пребывания в открытом космосе составляла 7, 12 и 18 месяцев. В этом эксперименте микроорганизмы, длительное время находившиеся на внешней поверхности МКС (1.5 года), в большинстве своем сохраняли жизнеспособность в условиях космической среды, но на значительно более низком уровне, чем в контроле.

Во втором эксперименте в рамках программы BIORISK биологическими тест-объектами служили стадии покоя различных таксономических групп (от бактерий до позвоночных животных и высших растений):

– бактерии рода *Bacillus*

– грибы родов *Penicillium* и *Aspergillus*

– семена *Brassica rapa, Arabidopsis thaliana* и др.

– покоящиеся эмбрионы *Daphnia magna* и *D. pulicaria*

– покоящиеся эмбрионы *Streptocephalus torvicornis*

– покоящиеся эмбрионы *Artemia salina*

– покоящиеся эмбрионы *Triops cancriformis*

– покоящиеся эмбрионы *Eucypris ornata*

– криптобиотические личинки хирономиды вида *Polypedilum vanderplanki*

– икра карпозубых рыб вида *Nothobranchius guentheri.*

16 февраля 2007 г. испытуемые объекты были помещены в три контейнера оборудования BIORISK-MSN, причем количество и состав объектов во всех контейнерах были одинаковыми. Споры бактерий и плесневых грибов наносились на металлические пластины, изготовленные из материалов, аналогичных тем, которые использовались для конструирования оболочки РС МКС. Семена растений, покоящиеся яйца низших ракообразных, насекомых и обезвоженную икру рыб помещали в пакеты из хлопчатобумажной ткани, а затем в пластиковые чашки Петри (рис. 9в). После этого оборудованный Биориск-2 был помещен на блок “Энергия” для доставки на РС МКС 15 апреля 2007 г. на космическом корабле “Союз-ТМА-10”. Устройство BIORISK-MSN было закреплено на внешней стороне МКС российскими космонавтами Ф.Н. Юрчишиным и О.В. Котовым 6 июня 2007 г. во время внекорабельной деятельности (ВКД). Из-за изменения плана работ на МКС первый контейнер был снят 15 июля 2008 г., т.е. через 13 мес., а не 6, как было

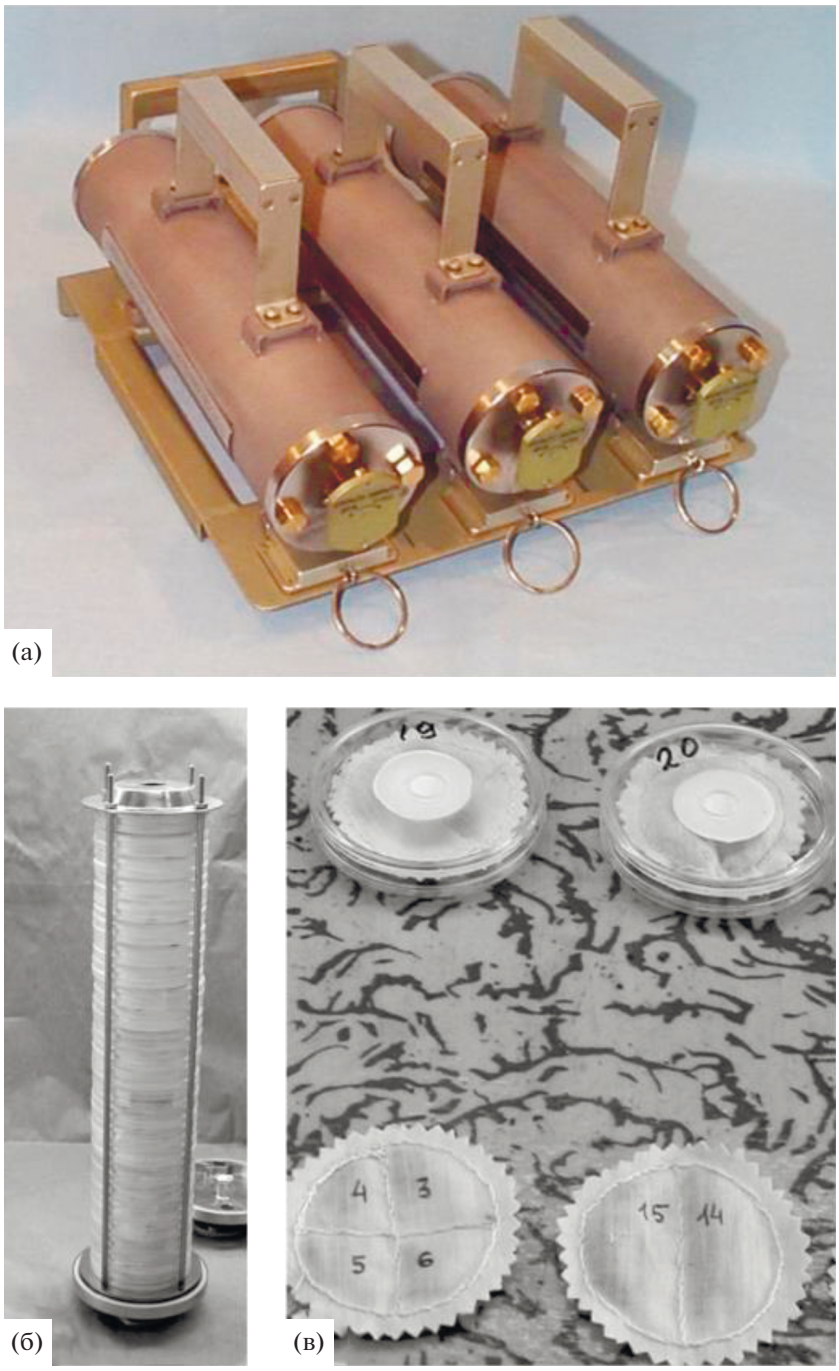
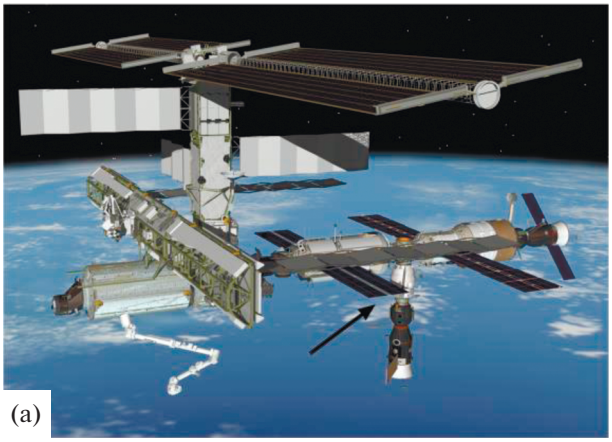


Рис. 9. Экспериментальный модуль BIORISK. а – Внешний вид контейнеров BIORISK; б – стопка чашек петри с биологическими образцами перед их установкой в контейнер; в – хлопчатобумажные пакеты с покоящимися эмбрионами водных организмов (ИМБП).

запланировано. Он был возвращен на Землю 24 октября 2008 г. и спустя несколько часов доставлен в ИМБП (Sychev, 2009). Осмотр металлического контейнера и изъятие чашек Петри, содержащих исследуемые объекты, были проведены незамедлительно. Внешний визуальный осмотр показал, что пластиковые чашки Петри были значительно деформированы нагреванием. Когда их вскрыли, оказалось, что металлические пластины с бактериальными и грибковыми спорами вплавлены в пластик, тогда как хлопчатобумажные матерчатые мешки, содержащие семена и покоящиеся яйца ракообразных и рыб, остались внешне неизменными (Alekseev *et al.*, 2009).

Покоящиеся яйца низших ракообразных и рыб исследовали в Зоологическом институте РАН



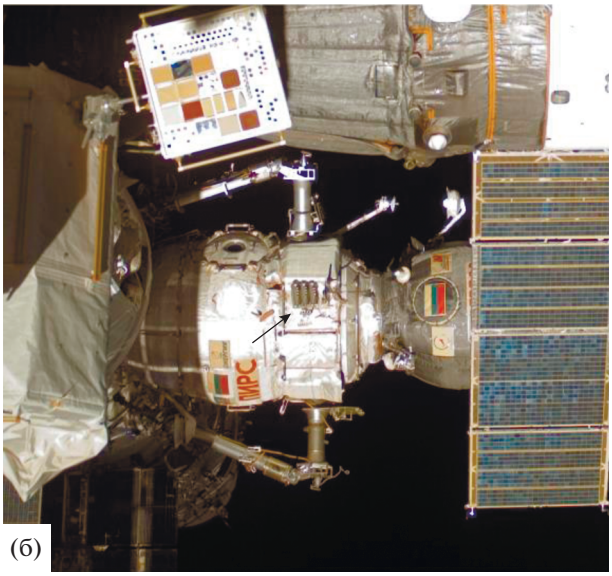


Рис. 10. Расположение экспериментального модуля BIORISK на корпусе МКС. а – Положение экспериментального модуля относительно МКС; б – положение контейнеров BIORISK на корпусе модуля “Пирс” российского сегмента МКС (NASA).

(Санкт-Петербург). Покоящиеся яйца всех видов листоногих раков остались жизнеспособными, хотя уровень реактивации яиц в эксперименте (на примере *Artemia salina*) был значительно ниже (примерно в пять раз), чем в контроле. Выживаемость покоящихся яиц щитней *Triops cancriformis* варьировала от 5 до 8%. Хотя лишь небольшая часть опытных яиц была способна к реактивации, рост вылупившихся щитней не отличался от такового в контрольной группе (Orlov *et al.*, 2017, Alekseev *et al.*, 2019). Было также показано, что остракода *Eucypris ornata* сохранила свою жизнеспособность и успешно размножалась в нескольких последовательных генерациях. Реактивация яиц *D. magna* началась после значительного запаздывания по сравнению с реактивацией яиц филлопод и остракод, чем напоминала реакцию эмбрионов этого вида на воздействие нейтронного излучения в однофакторном эксперименте, описанном выше. Полетный образец яиц *D. magna* после реактивации показал несколько типов повреждений у новорожденных, которых можно было разделить на три группы одинакового размера, различающиеся по степени повреждения: 1) особи, умершие сразу после рождения, 2) особи, дожившие до половой зрелости, но неспособные к размножению, и 3) особи, способные к воспроизводству нескольких поколений. Потомство, полученное от успешно переживших длительную экспозицию в открытом космосе, происходило от рачков с различными сроками начала реактивации. Они были исследованы биохимическими методами с целью выявления внутрипопуляционного полиморфизма по белковым локусам (Abramson, Alekseev, 2009). Оказалось, что особи, выходящие из яиц в начале и конце периода реактивации, не только различались по массе тела (первые были крупнее), но и относились к разным клонам, очевидно различавшимися по чувствительности к стресс-факторам космической среды. В контрольной группе эти клоны по срокам реактивации достоверно не различались. Среди высокочувствительных к космическому стрессу выделилась еще одна группа клонов с повышенным уровнем откладки покоящихся яиц, при тех же условиях, что и у остальных, что также можно интерпретировать как повышенную реакцию на стресс, сходную с ранее обнаруженным повышенным производством самцов при внутристанционном экспонировании яиц этого вида (см. выше программу АКВАРИУМ).

Интересные результаты были получены при сравнении выживания в открытом космосе в долгосрочных экспериментах у организмов с разным уровнем в теле полисахарида трегалозы, замещающего воду при высыхании клеток и являющимся протектором белковых соединений у многих беспозвоночных (Okuda, 2008; Gusev *et al.*, 2009).

В каждом из исследованных отрядов ракообразных и насекомых были получены достоверные данные по успешному переживанию их покоящимися стадиями многомесячного воздействия факторов открытого космического пространства (табл. 5). Наибольшая выживаемость была установлена для *Artemia salina* и *Eucypris ornata*. Вместе с тем, покоящиеся стадии некоторых видов не смогли пережить длительное нахождение в открытом космосе, что, по нашему мнению было связано:

– *с высоким содержанием воды* в покоящихся яйцах у ряда видов ракообразных, использованных в экспериментах. Реактивация среди обводненных эмбрионов рода *Chirocephalus* после 13 месячной экспозиции не была отмечена ни в одном из 6 вариантов. В то же время среди обезвоженных эмбрионов близкого вида *Streptocephalus tor-*

Таблица 5. Реактивация покоящихся стадий водных организмов после 13-ти месячной экспозиции в космическом пространстве в аппарате BIORISK-MSN-2

Вид	Размер	Состояние	% Реактивации от контроля
Daphnia magna	Крупные	Зимняя диапауза	11
	Мелкие		35
Daphnia pulicaria	Смесь	Летняя диапауза	0
Streptocephalus tovicornis	Крупные	Дегидрированный	42
	Мелкие		14
Chirocephalus sp.	Смесь	Обводненный	0
Eucypris ornata	Смесь	Диапауза	7
Artemia salina	Смесь	Диапауза	60
Triops cancriformis	Смесь	Диапауза	14
Polypedium vanderplanki	Смесь	Диапауза	80
Nothobranchius guentheri	Смесь	Диапауза	0

vicornis реактивация составила от 14 до 42% от контроля;

– *с различной глубиной диапаузы*. У видов рода *Daphnia* глубокая зимняя диапауза вызывается сочетанием следующих факторов: высокая плотность популяции, короткий день (12 ч световой фазы), плохие условия питания и накопление биоинформации в ряду поколений путем материнской передачи (Alekseev, Lampert, 2001). У клона, использованного в нашем эксперименте *Daphnia pulicaria*, полученного из коллекции профессора Ламперта (институт лимнологии Макса Планка), поверхностная летняя диапауза была индуцирована единственным фактором – ухудшением трофических условий. В то же время фотопериод (длинный день с 16 ч световой фазы) и низкая плотность популяции не способствовали формированию сигнала для перехода к гаметогенезу (Alekseev, Lajus, 2009). Реактивация покоящихся яиц у дафний после экспонирования в космосе была достигнута только у эмбрионов с глубокой (зимней) диапаузой (*D. magna*) (см. табл. 5). Ни один эмбрион *D. pulicaria* с поверхностной летней диапаузой в 6 повторностях космического эксперимента не проявил признаков жизни;

– *с тропическим происхождением вида*. Диапауза высыхающей икры карпозубых рыб в природе длится несколько месяцев и не устойчива к низким температурам. Этим, видимо, объясняется их полная смертность в опыте и контроле через 13 месяцев. В 6 месячном эксперименте были реактивированы и успешно развивались только эмбрионы рыб контрольной группы, поскольку этот вариант Биориска не был своевременно доставлен на Землю, и разделить действие низких температур и длительности пребывания икры рыб в космосе на выживание по этой причине оказалось невозможным (Alekseev *et al.*, 2009).

Эксперимент “Биофобос-Анабиоз”. Проект Роскосмоса ФОБОС-ГРУНТ изначально имел сугубо геологическую направленность. Он предполагал экспедицию возвращаемого аппарата к этому спутнику Марса, из которой он должен был доставить на Землю однометровую колонку грунта, высверленную с поверхности Фобоса (Зеленый, Захаров, 2011). По мере разработки исследовательской программы, по предложению В.Н. Сычева (ИМБП РАН, Москва), в возвращаемый на Землю блок были добавлены два небольших контейнера (11 × 35 мм) с покоящимися стадиями 50 видов организмов, включая цианобактерии, примитивные грибы, диапаузирующие яйца дафний, копепод, листоногих раков, остракод, личинок двукрылых насекомых, цисты одноклеточных зеленых водорослей и семена сосудистых растений (Novikova *et al.*, 2010; Орлов и др., 2011). Будучи элементами трех экосистем (почвенной, водной и наземной) в случае удачного перенесения длительного полета через открытый космос в слабо защищенном состоянии (устранен фактор УФ) покоящиеся стадии этих видов могли стать основой разработки технологии межпланетной транспортировки и создания искусственных биологических систем рециклинга кислорода и других жизненно важных компонентов на обитаемых станциях вне земной биосферы. В мае–июне 2009 г. биообъекты были размещены в запаянных пластиковых пакетах. В июне 2009 г. пластиковые пакеты были помещены в две “Фобос-капсулы” (по 66 в каждом) и установлены на возвращаемом модуле. По техническим причинам старт проекта был отложен. 15 апреля 2010 г. биологические об-

разцы сняты с модуля. Извлеченные пакеты в марте 2011 г. вместе с вновь подготовленными пакетами семян сосудистых растений и диапаузирующими личинками двукрылых насекомых были размещены в оборудовании программы BIORISK, 27 апреля доставлены на МКС и 4 августа вынесены на внешнюю сторону в качестве орбитального (ближний космос) контроля эксперимента. Фобос-капсулы были заправлены партиями свежих образцов, но, к сожалению, по техническим причинам, выведенный на околоземную орбиту ракетный комплекс с аппаратом Фобос-Грунт не смог запустить разгонную систему для выхода на запланированную траекторию к Марсу. После нескольких месяцев вращения на околоземной орбите аппарат был утрачен, а вместе с ним – и столь важная возможность проведения долгосрочного эксперимента по влиянию глубокого космоса на выживание покоящихся стадий животных и растений.

В отличие от него орбитальный контроль BIORISK был благополучно доставлен на Землю после 31-месячной экспозиции на орбите. Полученные результаты в целом подтвердили уже установленные ранее данные по выживанию покоящихся стадий низших и высших организмов в условиях открытого космоса. Численные значения доли выживших эмбрионов водных животных оказались несколько ниже, чем на первых этапах эксперимента BIORISK-2, что неудивительно, учитывая сложную историю их предполетного хранения (почти 2 года в лабораторных условиях и на полетном модуле Фобос-Грунта). Тем не менее, среди всех изученных организмов были обнаружены успешно пережившие космическую экспедицию особи. Наивысший процент реактивации, а значит и наибольшую устойчивость, проявили покоящиеся стадии артемий, дафний и личинки двукрылых, которые и были рекомендованы в качестве оптимальных объектов для исследований в космическом пространстве. Это было учтено в последовавших экспериментах.

Заключение по экспериментам программы BIORISK. Целью экспериментов BIORISK в открытом космосе было накопление данных о потенциальных проявлениях или границах фенотипической адаптации и генотипических изменениях бактериально–грибковых ассоциаций, регулярно встречающихся на конструкционных материалах космических аппаратов. Основной целью первого эксперимента в серии была проверка жизнеспособности этих видов в конструкционных системах космических аппаратов после длительного воздействия (сравнимого с длительностью полета на Марс) в открытом космосе (Alekseev *et al.*, 2007, Novikova *et al.,* 2011, Alekseev *et al.*, 2019). Вторая цель состояла в том, чтобы оценить влияние космического полета на исследуемые биологические образцы. Как известно, не только микробы, но и некоторые многоклеточные организмы обладают способностью переходить в состояние покоя при неблагоприятных условиях окружающей среды. Не будет преувеличением сказать, что многие живые существа могут достичь состояния, в котором их жизнедеятельность временно практически прекращается, чтобы пережить неблагоприятное воздействие окружающей среды, даже в условиях космического пространства. Эти состояния различаются по механизмам, позволяющим различным организмам достигать стадии покоя, а также по уровням покоя, обеспечивающим их выживание. При диапаузе и криптобиозе организмы могут выдерживать широкий спектр экстремальных химических и физических воздействий (Данилевский, 1961; Алексеев, 1990), что делает возможным их перенос через космическое пространство.

В связи с этим второй эксперимент BIORISK, включавший исследование многоклеточных животных (ракообразные, насекомые, рыбы, сосудистые растения), после их пребывания в открытом космосе в течение времени, аналогичного продолжительности полета на Марс, стал новым шагом в понимании пределов выживания земных организмов в экстремальных условиях (Alekseev *et al.*, 2006). Из негативных факторов открытого космоса не оцененным вследствие конструктивных особенностей устройства BIORISK осталось лишь воздействие прямых солнечных лучей, с высокой долей ультрафиолетового спектра. Кроме этого среди полученных данных отсутствовали также количественные оценки температуры и уровня космической радиации, как накопленные дозы, так и максимальные ее значения, что затрудняло интерпретацию ряда наблюдаемых эффектов. Эти недостатки были во многом преодолены при реализации последовавших космических программ EXPOSE.

Имитация условий на Марсе и программа EXPOSE. Программа EXPOSE – космический биологический эксперимент на МКС в поддержку марсианской миссии. Многофункциональное устройство EXPOSE (рис. 11) было подготовлено для длительных астробиологических экспериментов в космосе на МКС. Оно было создано Европейским космическим агентством (EKA) для испытания деградации биологических материалов (аминокислот) и спор примитивных организмов (бактерий, грибов) в космосе (внутри метеоритов) и в условиях на поверхности Марса (de Vera *et al.*, 2019). В отличие от аппаратуры программы BIORISK, аппарат EXPOSE был способен записывать или даже в ряде случаев регулировать различные типы экологических параметров (солнечное излучение, космическую радиацию, температуру) во время экспонирования биологических образцов в космосе, включая ультрафиолетовое излучение (Novikova *et al.* 2018; de Vera *et al.* 2019).

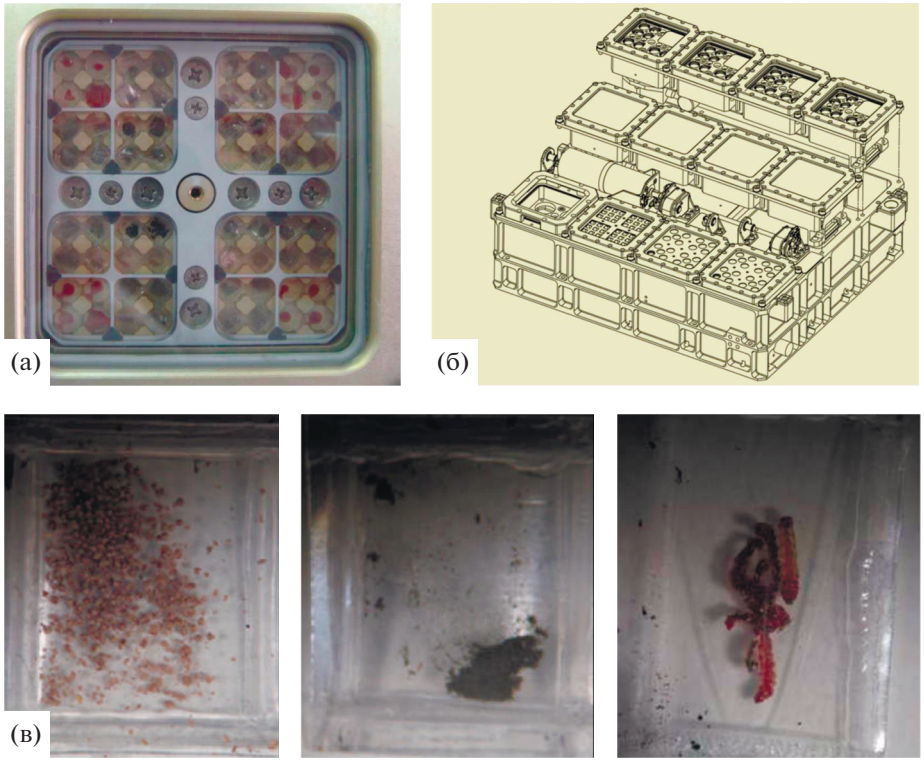


Рис. 11. Экспериментальный модуль EXPOSE-R. а – Заполненная кассета с биологическими образцами; б – конструкция модуля; в – герметичные пластиковые пакеты с биологическими образцами (ИМБП, Rabbow *et al.*, 2009).

Первый аппарат этой серии, EXPOSE-E, был подготовлен для доставки на МКС Национальным управлением по аэронавтике и исследованию космического пространства США (NASA), запущен 7 февраля 2008 г. и возвращен на Землю 12 сентября 2009 г. Аппарат был размещен на внешней стороне европейского лабораторного модуля “Коламбус” и содержал споры бактерий и грибов и семена растений (Rabbow *et al.*, 2009; Berger *et al.*, 2012).

Следующий проект EKA EXPOSE-R был разработан в содружестве с Роскосмосом и доставлен на МКС в составе российского груза транспортного комплекса Протон и размещен вне МКС на российском модуле “Звезда” (рис. 12). Среди новых конструктивных особенностей появилась возможность заменять индивидуальные емкости (подносы) с исследуемыми организмами в процессе полета. Наряду с вышеупомянутым набором биологических объектов, подготовленных EKA, он содержал российский блок с семенами высших растений и покоящимися стадиями нескольких водных беспозвоночных, выживших в космических экспериментах BIORISK (Baranov *et al.,* 2009; Orlov *et al.*, 2017). Все эти объекты были помещены в небольших пластиковых пакетах в экспозиционных гнездах в три слоя и отделены от космического пространства светофильтрами разной проницаемости, незначительно снизившими ультрафиолетовое воздействие на верхний слой (Rabbow *et al.*, 2009).

Эксперименты EXPOSE-R и EXPOSE-R2. После более чем 1.5-летнего пребывания в открытом космосе споры микроорганизмов и грибов, а также семена двух видов растений (*Arabidopsis thaliana* и томат *Lycopersicum esculentum*) и покоящиеся яйца ракообразных (*Artemia franciscana*, *Eucypris ornata*, *Daphnia magna* и *Streptocephalus torvicornis*) были проанализированы на жизнеспособность и некоторые параметры жизненного цикла. Практически все организмы, находящиеся в первом слое образцов, в эксперименте EXPOSE, погибли, что, очевидно, было связано с воздействием солнечного излучения, поскольку радиационный фон был аналогичен Биориску, а температурные условия, регулируемые прибором (см. табл. 4) были значительно мягче. Во втором слое и особенно в третьем последнем, часть организмов сохранила жизнеспособность (Alekseev *et al.*, 2012; Novikova *et al.*, 2015). Из водных организмов наибольшую устойчивость, как и предполагалось, проявили покоящиеся стадии артемий, защищенные несколькими оболочками и глубоким криптобиозом. Эксперимент показал, что не только бактериальные и грибковые споры, но также и покоящиеся стадии растений и ракообразных способны выдерживать длительное воздействие факторов открытого космического пространства,

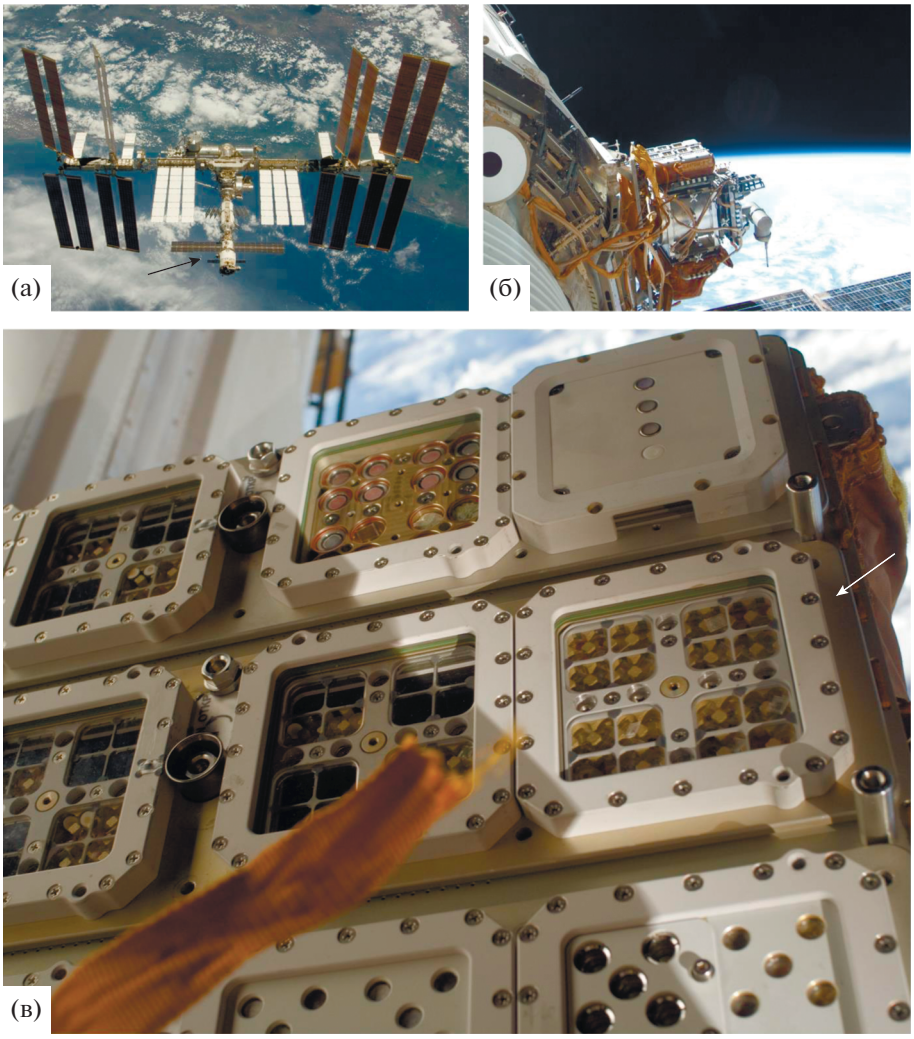


Рис. 12. Расположение экспериментального модуля EXPOSE-R на корпусе МКС. Белая стрелка указывает на емкость с покоящимися стадиями водных организмов. а – Положение экспериментального модуля относительно МКС; б – положение аппарата на поверхности модуля "Звезда" российского сегмента МКС; в – положение кассеты с покоящимися эмбрионами водных организмов (NASA, Роскосмос).

в том числе ультрафиолетового излучения, но с некоторой защитой, которой являлись поверхностные слои экспериментальных образцов. Покоящиеся яйца двух ракообразных (*A. franciscana* и *E. ornate*) показали увеличение процента выживших (реактивированных) эмбрионов по мере удаления от первого слоя, что совпадало с ослаблением ультрафиолета в этом направлении (рис. 13). Два других вида водных ракообразных (*D. magna* и *S. torvicornis*) гораздо хуже сохранились во всех образцах. Немногие из выживших *D. magna* демонстрировали разную степень повреждения эмбрионов от гибели их сразу после вылупления до достижения самками половозрелого возраста и установленной невозможности ими производить потомство.

Даже бактерии и грибы в первом слое, подвергшиеся воздействию прямого УФ излучения, погибли (de Vera *et al.*, 2019). В то же время в третьем слое, где практически не отмечалось воздействие УФ, грибы проявили очень высокие показатели выживаемости (до 100% по сравнению с контрольными образцами) (Novikova *et al.*, 2015). Такого высокого выживания никогда не было обнаружено в экспериментах Биориска, где некоторые виды грибов полностью погибли, а у переживших 18-месячный полет видов процент выживания не превышал 0.04% (Novikova *et al.*, 2014). В эксперименте EXPOSE-R отдельные споры грибов смогли выжить даже в верхнем слое у тех видов, споры которых располагались более плотно и составляли некоторую защиту от УФ, а в нижних слоях выживание было сопоставимо с контролем (Novikova *et al.*, 2015). Это показывает, на наш взгляд, роль температурного фактора в снижении жизнеспособности покоящихся стадий, поскольку в

эксперименте BIORISK температура колебалась в интервале +100...–100, а в EXPOSE-R +49...–24°C (см. табл. 4). Смягчение амплитуды температур в эксперименте EXPOSE-R было почти трехкратным и не выходило за пределы колебаний этого фактора, наблюдаемых в земных условиях.

EXPOSE-R продемонстрировал, что жизнеспособность покоящихся яиц артемий и остракод увеличивается при уменьшении интенсивности ультрафиолетового излучения. Покоящиеся яйца *Daphnia magna* и *Streptocephalus torvicornis* практически не выдержали воздействия открытого космического пространства в условиях EXPOSE-R, со смягченными колебаниями температуры, но с проникающим ультрафиолетовым излучением высокой интенсивности (Novikova *et al.*, 2014). Основным фактором, который был вреден для последних двух видов, стало ультрафиолетовое излучение. В отсутствии этого воздействия (программа BIORISK) ~30% покоящихся яиц этих видов выжили, успешно прошли эмбриональное развитие и создали нормальные размножающиеся популяции, по меньшей мере, в двух последующих поколениях (Alekseev *et al.*, 2009).

Для преодоления столь вредного (зачастую для многих смертельного) воздействия солнечного света на живые организмы была изменена конструкция модуля EXPOSE-R2. Окна предусматривали создание различных уровней ультрафиолетового облучения требуемого спектра. Исследуемые образцы размещались в индивидуальные емкости в 2–3 слоя. Так же, как и в EXPOSE-R, максимальному воздействию ультрафиолетового излучения подвергался только верхний слой (Rabbow *et al.*, 2017). У многих видов бактерий, грибов и растений было вновь показано, что выживаемость спящих стадий в космическом пространстве увеличивается по мере снижения уровня ультрафиолетового излучения (Novikova *et al.*, 2018). В EXPOSE-R2 также участвовали покоящиеся стадии двух водных беспозвоночных (комара *Polypedilum vanderplanki* и щитня *Triops cancriformis*), но, к сожалению, результаты этих экспериментов до сих пор не опубликованы.

Использование модуля EXPOSE завершилось в 2016 г. Сейчас идет работа над новым модулем “Exobiology”, который должен расширить возможности сбора данных “на месте” (Research in Space 2017 and Beyond, 2017).

Резюме экспериментов по покою в открытом космосе. Подводя итог, можно сказать, что исследование выживания покоящихся стадий организмов в космической среде имеет как теоретическое, так и практическое значение.

Исследование BIORISK впервые продемонстрировало, что бактериальные и грибковые споры, а также высшие растения и членистоногие могут выдерживать длительное (до 31 мес.) воздействие

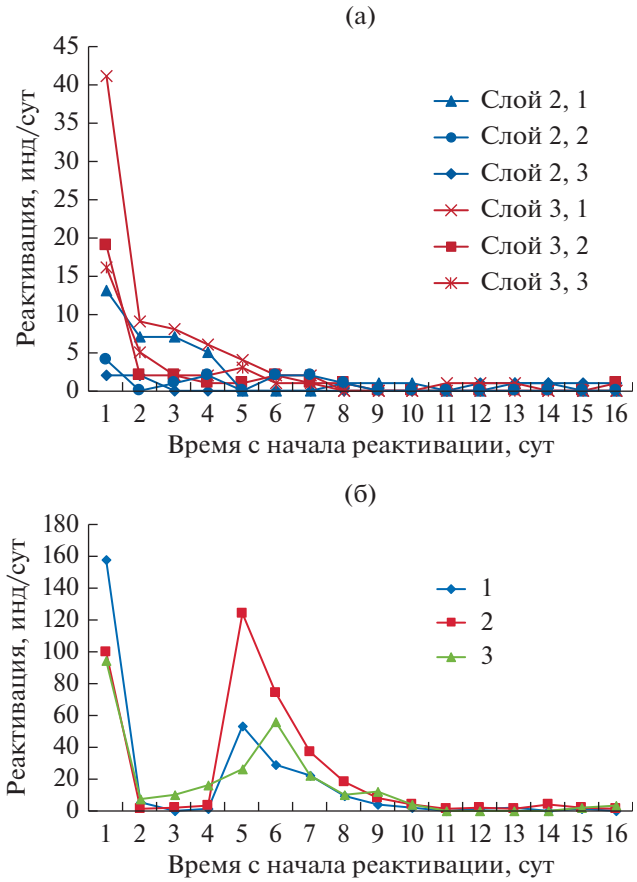


Рис. 13. Вылупление покоящихся стадий *Artemia franciscana*: а – после 22 месяцев воздействия факторов космического полета внутри аппарата EXPOSE-R (слои 2 и 3); б – в условиях лабораторного контроля Земли. Каждый вариант был выполнен в трех повторностях (1, 2, 3); количество цист составляло 600 на образец в контроле и 150 на образец в группе МКС.

суровых условий открытого космического пространства. Это позволяет предположить, что наземные и водные организмы могут быть доставлены на другие планеты нашими космическими аппаратами, особенно пилотируемыми, несмотря на строгие процедуры обращения с отходами.

Сравнение результатов, полученных в экспериментах BIORISK и EXPOSE, в которых споры микроорганизмов и грибов (а также спящие стадии растений и водных животных) подвергались воздействию космических факторов в течение 31 и 22 мес. соответственно, позволяет сделать следующий вывод: космическое ультрафиолетовое излучение является наиболее мощным отрицательным фактором, влияющим на живую материю в космической среде. В эксперименте EXPOSE-R практически все организмы в верхнем слое устройства погибли.

Биологический покой у тропических организмов (высушенные яйца рыб-карподонтов) и эфип-

пиев дафний, образованных летом, оказались не способными защитить покоящиеся эмбрионы от повреждающих воздействий космического пространства. Покоящиеся яйца двух ракообразных (*D. magna* и *S. torvicornis*) были чувствительны к сигналам стресса внутри МКС, и не выдерживали солнечного излучения за ее пределами. Артемии и остракоды показали самую высокую устойчивость среди многоклеточных организмов и обладают хорошим потенциалом для проведения астробиологических экспериментов в условиях космического пространства.

Концепция покоя представляет большой интерес для поиска внеземной жизни. Установленные факты длительного выживания покоящихся стадий водорослей, бактерий, грибов и даже беспозвоночных в космическом пространстве вселяют надежду на то, что мы сможем найти жизнь за пределами Земли. Это подразумевает возможность межпланетной передачи форм жизни метеоритами, кометами и другими телами. С другой стороны, это допускает возможность транспортировки земной жизни автоматическими устройствами и непосредственно человеком при межпланетных перелетах.

Наконец, мы можем снова постулировать, что небесные тела, где земные формы едва ли могут существовать, могут быть населены организмами, которые остаются спящими в течение большей части их жизненного цикла. Условия на Марсе, которые были частично имитированы в программе EXPOSE, выявили довольно значительную вероятность (более 90% для грибов) выжить в защищенной от света среде (в земле или в постоянной тени), даже для земных организмов. С одной стороны, это увеличивает риск заноса земных форм жизни на интактные планеты и последующего нахождения на них живых существ, которые, на самом деле имеют земное происхождение. Но с другой стороны, это показывает, что есть шанс обнаружить местную жизнь на Марсе и других небесных телах со сходными условиями, где-то в постоянной тени (глубокие ямы, гроты и пещеры) или под поверхностью, вблизи полярной области таяния льда. Именно эти места должны стать, на наш взгляд, первоочередной целью при поиске жизни на Марсе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проведенные эксперименты с покоящимися стадиями гидробионтов в условиях космического полета позволили существенно расширить представление о способности живых организмов к выживанию в экстремальных условиях.

2. Эксперименты внутри космической станции установили, что покоящиеся стадии ракообразных даже в сухом состоянии способны воспринимать и реагировать на неблагоприятные условия (прежде всего на воздействия нейтронного излучения) как на стресс и отвечать на воздействие этого фактора изменением типа размножения с резким увеличением продуцирования самцов во втором поколении.

3. Длительные эксперименты в условиях открытого космоса допускают возможность переноса покоящихся стадий земных организмов на другие планеты при минимальной защите от ультрафиолетового излучения солнца.

4. Покоящиеся эмбрионы *D. magna* оказались чувствительны к воздействию радиации и ряда других внутрикорабельных факторов. Эмбрионы этого виды могут быть, вероятно, использованы для оценки кумулятивного эффекта внутрикорабельных слабых негативных факторов на биологические объекты, как своего рода индикаторы биологического стресса. Артемии, экстремофильный вид гиперсоленых озер, являются вероятным остатком фауны древнего моря Тетис. Цисты артемий проявили максимальную устойчивость к негативному воздействию условий открытого космоса и могут быть рекомендованы для экспериментов с биологическими объектами в открытом космосе.

5. Покоящиеся стадии большинства ракообразных, по-видимому, смогут сохранять жизнеспособность в условиях Марса, однако для завершения жизненного цикла им необходима, по меньшей мере, жидкая фаза воды для активной стадии развития. Возможность реализации такого цикла развития в условиях Марса требует специального изучения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность всем сотрудникам Института медико-биологических проблем РАН и членам экипажей МКС, участвовавших в подготовке и проведении экспериментов с покоящимися стадиями в космическом полете. Особую признательность выражаю сотрудникам ИМБП Н.Д. Новиковой и М.А. Левинских за консультации. При проведении экспериментов с измененным магнитным полем техническую поддержку оказал сотрудник Института биологии внутренних вод РАН В.В. Крылов. Автор также благодарен участникам международных проектов РФФИ-Япония, РФФИ-Тайвань за их помощь в выполнении исследований. Профессор В. Ламперт (W. Lampert, Плоен, Германия) оказал неоценимую помощь в обеспечении приборной базы Института Лимнологии Макса Планка, использованной при выполнении эксперимента внутри МКС, и обсуждении его результатов. Автор искренне благодарит анонимного рецензента за ценные замечания, несомненно способствовавшие улучшению восприятия текста обзора. Большую помощь в подготовке и оформлении рукописи статьи оказала О.А. Чабан.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Написание этого обзора было инициировано и поддержано грантом РФФИ Экспансия (19-14-50004). Работа выполнена при частичной поддержке Федеральной программы по изучению биоразнообразия животного мира (АААА-А19-119020690091-0) РАН. При ее подготовке была задействована Федеральная коллекция Зоологического института РАН и гранта РФФИ 20-04-00035.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены. Люди в данном исследовании не участвовали в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Алексеев В.Р. Диапауза ракообразных: эколого-физиологические аспекты. М.: Наука. 1990. 215 с.

Алексеев В.Р. Физиологические и молекулярно-генетические основы механизма биологического покоя у водных беспозвоночных // Онтогенез. 2010. Т. 41. № 2. С. 83–93.

Алексеев В.Р., Левинских М.А., Сычев В.Н. Влияние условий космического полета на покоящиеся стадии низших ракообразных. Эксперименты “Аквариум” // Космическая биология и медицина. Медико-биологические исследования на российском сегменте МКС. М.: Научная книга. 2011. Т. 2. С. 340–351.

Данилевский А.С. Фотопериодизм и сезонное развитие насекомых. Л.: Наука. 1961. 243 с.

Зеленый Л.М., Захаров А.В. Проект “Фобос-Грунт”: приборы для научных исследований // Вестник НПО им. СА Лавочкина, 2011. Т. 3. С. 31–34.

Орлов О.И., Дешевая Е.А., Левинских М.А., Новикова Н.Д., Поддубко С.В., Поликарпов Н.А., Сычев В.Н., Алексеев В.Р., Воробьева Е.А., Гальченко В.Ф., Захаров А.В., Муравенко О.В. Эксперимент “Биофобос/Анабиоз” // Фобос-Грунт. Проект космической экспедиции. ИКИ РАН, НПО им. А. Лавочкина, Москва. 2011. Т. 2. С. 483–493.

Сычев В.Н., Левинских М.А., Подольский И.Г., Новикова Н.Д., Гостимский С.А., Алексеев В.А., Бингхем Г. Основные результаты экспериментов по изучению высших растений и покоящихся форм организмов на борту Российского сегмента Международной Космической Станции // Космонавтика и ракетостроение. 2007. Т. 4. № 49. С. 54–64.

Шепелев Е.Я. Биологические системы жизнеобеспечения // Основы космической биологии и медицины. М.: Наука. 1975. Т. 3. С. 277–307.

Abramson N., Alekseev V. Mechanisms and peculiarities of dormancy in vertebrates and invertebrates // Int. Conf. Use of Dormancy in Space Researches, St-Petersburg, Russia. 2009.

Alekseev V.R., Lajus D.L. Maternal and direct effects of natural-like changes of photoperiod and food condition manipulation on life history parameters in *Daphnia* // Aquatic ecology. 2009. V.43. № 2. P. 415–421.

Alekseev V., Lampert W. Maternal control of resting-egg production in *Daphnia* // Nature. 2001. V. 414. P. 899–901.

Alekseev V.R., Levinskih M.A., Novikova N.D., Sychev V.N., Okuda T. Effects of some space flight factors on termination and survivorship in crustacean resting stages // Int. Conf. Use of Dormancy in Space Researches, St-Petersburg, Russia. 2009.

Alekseev V.R., Levinskikh M.A., Novikova N.D., Sychev V.N. Studying Dormancy in Space Conditions // Dormancy in Aquatic Organisms. Theory, Human Use and Modeling. Springer. 2019. P. 97–119.

Alekseev V., Novikova N., Levinskikh M., Sychev V., Yusoff F., Azuraidi O. Expose-R experiment on effects of open space condition on survivorship in dormant stages of aquatic invertebrates // 39th COSPAR Scientific Assembly, Mysore. 2012. V. 39. P. 36.

Alekseev V.R., Starobogatov Y.I. Types of diapause in Crustacea: definitions, distributions, evolution // Hydrobiologia. 1996. V. 320. P. 15–26.

Alekseev V., Sychev V. Effects of space station conditions on resting egg survivorship and life cycle parameters in *D. magna* // 36th COSPAR Scientific Assembly, Beijing. 2006. http://www.meetings.copernicus.org/www.cosis.net/abstracts/COSPAR2006/00189/COSPAR2006-A-00189.pdf

Alekseev V., Sychev V., Layus D., Levinsky M., Novikova N., Zakhodnova T. Perspectives of biotechnologies based on dormancy phenomenon for space researches // 36th COSPAR Scientific Assembly, Beijing. 2006.

Alekseev V.R., Sychev V.N., Novikova N.D. Studying the phenomenon of dormancy: why it is important for space exploration // Diapause in Aquatic Invertebrates Theory and Human Use. Springer. 2007. P. 207–214.

Baranov V.M., Novikova N.D., Polikarpov N.A., Sychev V.N., Levinskikh M.A., Alekseev V.R., Okuda T., Sugimoto M., Gusev O.A., Grigor'ev A.I. The Biorisk Experiment: 13-Month Exposure of Resting Forms of Organism on the Outer Side of the Russian Segment of the International Space Station: Preliminary Results // Doklady Biological Sciences. 2009. V. 426. P. 267–270.

Berces A., Egyeki M., Fekete A., Kovacs G., Ronto G. Biological ultraviolet dosimetry in low-Earth's Orbit // Astrobiology & Outreach. 2013. V. 1. P. 104.

Berger T., Hajek M., Bilski P., Körner C., Vanhavere F., Reitz G. Cosmic radiation exposure of biological test systems during the EXPOSE-E mission // Astrobiology. 2012. V. 12. № 5. P. 387–392.

Berger T., Hajek M., Bilski P., Reitz G. Cosmic radiation exposure of biological test systems during the EXPOSE-R mission // International J. Astrobiology. 2015. V. 14. № 1. P. 27–32.

Dachev T., Horneck G., Häder D.P., Schuster M., Lebert M. EXPOSE-R cosmic radiation time profile // International J. Astrobiology. 2015. V. 14. № 1. P. 17–25.

Dachev T., Horneck G., Häder D.P., Schuster M., Richter P., Lebert M., Demets R. Time profile of cosmic radiation exposure during the EXPOSE-E mission: the R3DE instrument // Astrobiology. 2012. V. 12. № 5. P. 403–411.

Ebert D. The trade-off between offspring size and number in *Daphnia magna* – the influence of genetic, environmental and maternal effects // Arch. Hydrobiol. Suppl. 1993. V. 90. P. 453–473.

Glazier D.S. Effects of food, genotype, and maternal size and age on offspring investment in *Daphnia magna* // Ecology. 1992. V. 73. № 3. P. 910–926.

Gusev O., Kikawada T., Okuda T. Biochemical and genetic mechanisms of survival of "sleeping chironomid" *Polypedilum vanderplanki* in extreme environments, including outer space // Int. Conf. Use of Dormancy in Space Researches, St-Petersburg, Russia. 2009.

Katajisto T. Copepod eggs survive a decade in the sediments of the Baltic Sea // Hydrobiologia. 1996. V. 320. № 1–3. P. 153–159.

Lampert W., Schmitt R.D., Muck P. Vertical migration of freshwater zooplankton: test of some hypotheses predicting a metabolic advantage // Bulletin of Marine Science. 1988. V. 43. № 3. P. 620–640

Lynch M. The Evolution of Cladoceran Life Histories // The Quarterly Review of Biology. 1980. V. 55. № 1. P. 23–42.

Matthiä D., Hassler D.M., de Wet W., Ehresmann B., Firan A., Flores-McLaughlin J., Guo J., Heilbronn L.H., Lee K., Ratliff H., Rios R.R., Slaba T.C., Smith M., Stoffle N.N., Townsend L.W., Berger T., Reitz G., Wimmer-Schweingruber R.F., Zeitlin C. The radiation environment on the surface of Mars – Summary of model calculations and comparison to RAD data // Life Sciences in Space Research. 2017. V. 14. P. 18–28.

Mo W., Liu Y., He R. Hypomagnetic field, an ignorable environmental factor in space // Science China Life Sciences. 2014. V. 57. № 7. P. 726–728.

Mousseau T.A., Fox C.W. Maternal effects as adaptations. Oxford University Press, New York. 1998. 375 p.

Muller H. Wachstum und Phosphatbedarf von *Nitzschia actinastroides* (Lemm.) v. Goor in statischer und homokontinuierlicher Kultur unter Phosphatlimitierung // Archiv fur Hydrobiologie Suppl. 1972. V. 33. P. 206–236.

NASA Mars Radiation Environment briefing, 2017. Briefing to NAC HEO/SMD Joint Committee Meeting "Mars Radiation Environment –what have we learned?". July 25 2017 https://www.nasa.gov/sites/default/files/atoms/files/mars_radiation_environment_nac_july_2017_final.pdf

Novikova N., Deshevaya E., Levinskikh M., Polikarpov N., Poddubko S., Gusev O., Sychev V. Study of the effects of the outer space environment on dormant forms of microorganisms, fungi and plants in the "Expose-R" experiment // Intern. J. Astrobiology. 2015. V. 14. № 1. P. 137–142.

Novikova N., Gusev O., Polikarpov N., Deshevaya E., Levinskikh M., Alekseev V., Okuda T., Sugimoto M., Sychev V., Grigoriev A. Survival of dormant organisms after long-term exposure to the space environment // Acta Astronautica. 2011. V. 68. № 9–10. P. 1574–1580.

Novikova N., Gusev O., Sugimoto M., Deshevaya E., Levinskikh M., Sychev V., Okuda T., Orlov O., Alekseev V., Poddubko S., Polikarpov N. Results of studies on long-term exposition of dormant forms of various organisms in outer space environment // 40th COSPAR Scientific Assembly, Moscow, Russia, 2014.

Novikova N., Orlov O., Deshevaya E., Sychev V., Khamidullina N., Aleksashkin S., Martynov M. Phobos-Grunt Mission: Planetary Protection Issues and how to Solve Them (the Approaches Based on the Exobiological Experiments Results) // 38th COSPAR Scientific Assembly, Bremen, Germany, 2010. P. 8.

Novikova N., Orlov O., Polikarpov N., Deshevaya E., Sychev V. The planetary quarantine problem and its substantiation on the basis of the results of exobiological experiments // J. Intern. Sci. Publications: Ecology Safety. 2014. V. 8. № 1000001. P. 111–119.

Novikova N., Poddubko S., Deshevaya E., Sychev V. Survival of bacterial and fungal spores in the Expose-R2 experiment // Intern. J. Bioass. 2018. V. 7. P. 5616–5622

Okuda T. Cryptobiosis // Encyclopedia of Entomology. Springer. 2008. P. 1128.

Orlov O.I., Novikova N.D., Polikarpov N.A., Levinskikh M.A., Deshevaya E.A., Sugimoto M., Alekseev V.R., Okuda T., Gusev O.A., Sychev V.N. Planetary protection challenges in space exploration missions and ways of their resolution with account of Russian exobiology experiments // REACH. 2017. V. 6. P. 25–33.

Rabbow E., Horneck G., Rettberg P., Schott J.U., Panitz C., L'Afflitto A., von Heise-Rotenburg R., Willnecker R., Baglioni P., Hatton J., Dettmann J., Demets R., Reitz G. EXPOSE, an astrobiological exposure facility on the International Space Station – from proposal to flight // Origins of Life and Evolution of Biospheres. 2009. V. 39. P. 581–598.

Rabbow E., Rettberg P., Barczyk S., Bohmeier M., Parpart A., Panitz C., Horneck G., Burfeindt J., Molter F., Jaramillo E., Pereira C., Weiß P., Willnecker R., Demets R., Dettmann J., Reitz G. The astrobiological mission EXPOSE-R on board of the International Space Station // Intern. J. Astrobiol. 2015. V. 14. № 1. P. 3–16.

Rabbow E., Rettberg P., Parpart A., Panitz C., Schulte W., Molter F., Jaramillo E., Demets R., Weiß P., Willnecker R. EXPOSE-R2: The Astrobiological ESA Mission on Board of the International Space Station // Front. Microbiol. 2017. V. 8. № 1533. P. 1–14.

Ramirez-Reveco A., Hernandez J.L., Aros P. Long-Term Storing of Frozen Semen at – 196 C does not Affect the Post-Thaw Sperm Quality of Bull Semen // Cryopreservation in Eukaryotes. 2016. P. 91.

Research in Space 2017 and Beyond. https://www.nasa.gov/sites/default/files/atoms/files/np-2017-04-014-a-jsc_iss_utilization_brochure_2017_web_6-5-17.pdf

Rettberg P., Rabbow E., Panitz C., Horneck G. Biological space experiments for the simulation of Martian conditions: UV radiation and Martian soil analogues // Adv. Space Res. 2004. V. 33. № 8. P. 1294–1301.

Sychev V. The main results and perspectives of dormancy uses in space researches // Int. Conf. Use of Dormancy in Space Researches, St-Petersburg, Russia. 2009.

Thirsk R., Kuipers A., Mukai C., Williams D. The spaceflight environment: the International Space Station and beyond // CMAJ. 2009. V. 180. № 12. P. 1216–1220.

Trotter B., Otte K.A., Schoppmann K., Hemmersbach R., Fröhlich T., Arnold G.J., Laforsch C. The influence of simulated microgravity on the proteome of *Daphnia magna* // Microgravity. 2015. V. 1. № 15016. P. 1–10.

Zhou D., Semones E., Gaza R., Johnson S., Zapp N., Weyland M. Radiation measured for ISS-Expedition 12 with different dosimeters // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment. 2007. V. 580. № 3. P. 1283–1289.

de Vera J-P., Alawi M., Backhaus T., Baqué M., Billi D., Böttger U., Berger T., Bohmeier M., Cockell C., Demets R., Noetzel R.T., Edwards H., Elsaesser A., Fagliarone C., Fiedler A., Foing B., Foucher F., Fritz J., Hanke F., Herzog T., Horneck G., Hübers H-W., Huwe B., Joshi J., Kozyrovska N., Kruchten M., Lasch P., Lee N., Leuko S., Leya T., Lorek A., Martínez-Frías J., Meessen J., Moritz S., Moeller R., Olsson-Francis K., Onofri S., Ott S., Pacelli C., Podolich O., Rabbow E., Reitz G., Rettberg P., Reva O., Rothschild L., Sancho L.G., Schulze-Makuch D., Selbmann L., Serrano P., Szewzyk U., Verseux C., Wadsworth J., Wagner D., Westall F., Wolter D., Zucconi L. Limits of life and the habitability of Mars: the ESA space experiment BIOMEX on the ISS // Astrobiology. 2019. V. 19. № 2. P. 145–157.

Wakayama S., Kamada Y., Yamanaka K., Kohda T., Suzuki H., Shimazu T., Tada M.N., Osada I., Nagamatsu A., Kamimura S., Nagatomo H. Healthy offspring from freeze-dried mouse spermatozoa held on the International Space Station for 9 months // Proc. Nat. Acad. Sci. 2017. V. 114. № 23. P. 5988–5993.

Study of Biological Dormancy of Aquatic Organisms in Open Space and Space Flight Conditions

V. R. Alekseev[#]

Zoological Institute RAS, St. Petersburg, 199034 Russia

[#]*e-mail: alekseev@zin.ru*

In outer space, ultraviolet and cosmic radiation, a wide range of high and low temperatures, altered gravity, electromagnetic fields, vacuum and their combination determine the damaging effect on living organisms and act as a barrier to their interplanetary propagation. At the same time, biological dormancy, known in a wide range of bacteria, fungi, animals and plants, makes it possible to preserve the viability of their dormant stages under extreme conditions for a long time. From 2005 to 2016, along with lower organisms, resting stages (propagules) of multicellular animals and plants were tested on the ISS to assess their ability to survive after prolonged exposure to the conditions of open space and space flight. Among the more than 40 species studied, about a third were dormant stages of aquatic organisms (Cyprinodontiformes fish eggs, daphnia ephippii, resting eggs of phyllopods and ostracods, diapausing larvae of dipterans). The experiments were carried out in the framework of four research programs: 1) inside the ISS station (AKVARIUM program) with a limited set of investigated species; 2) outside the station in outer space, but without exposure to ultraviolet radiation (BIORISK programs); 3) in modified space conditions simulating the surface of Mars (EXPOSE-R program); 4) in ground-based experiments, in which a laboratory assessment of the impact of cosmic factors on resting stages was carried out, as well as the study of some separately taken factors of space flight (such as neutron radiation). Fundamentally new data were obtained on the stability of the resting stages of terrestrial organisms to the factors of the cosmic environment, which changed the idea of the possibility of bringing terrestrial life forms to other planets with spacecraft and astronauts.

Keywords: diapause, space flight factors, ISS, interplanetary quarantine, astrobiology, hydrobiology, microgravity, cosmic radiation, ultraviolet light, magnetic field, temperature effect, search for extraterrestrial life forms

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 6, с. 588–593

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

УДК 577.121:577.344

АНТИОКСИДАНТЫ В СТЕКЛОВИДНОМ ТЕЛЕ ГЛАЗА ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2021 г. И. Г. Панова*, @, Ю. В. Сухова**, А. С. Татиколов***, П. П. Левин***, Т. Ю. Иванец**

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

**НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова МЗ РФ, ул. Академика Опарина, 4, Москва, 117997 Россия

***Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334 Россия

@E-mail: pinag@mail.ru

Поступила в редакцию 01.07.2020 г.
После доработки 26.07.2020 г.
Принята к публикации 28.08.2020 г.

С помощью метода лазерного фотолиза показано присутствие антиоксидантов–доноров электрона и произведена оценка их общего содержания (не менее 700–1000 мкмоль/л) в стекловидном теле глаза человека в раннем пренатальном развитии. В стекловидном теле определена концентрация мочевой кислоты и показано присутствие катехоламинов (дофамина, норадреналина, адреналина) – антиоксидантов, обладающих электроно-донорными свойствами. Содержание антиоксидантов в системе развивающегося глаза, обеспечивающее его редокс-статус, является важным показателем для оценки нормы и патологии глаза и существенно для прогнозирования и интерпретации заболеваний глаз у новорожденных и принятия адекватных подходов к их лечению.

DOI: 10.31857/S1026347021050115

Одним из механизмов для корректировки развития глаза является система антиоксидантной защиты. Дисбаланс между продукцией и деградацией свободных радикалов приводит к окислительному стрессу, при этом сверхэкспрессия свободных радикалов является повреждающим фактором для клеток, приводящим к нарушению процессов пролиферации, повреждению липидов, белков, нуклеиновых кислот и т.д. (Sies *et al.*, 2017).

Во время эмбрионального и плодного развития сетчатка и хрусталик, имеющие в составе клеточных мембран высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот, особенно нуждаются в антиоксидантной защите. Кровеносные гиалоидные сосуды стекловидного тела в процессе роста и регрессии, сосудистая сумка хрусталика, хориокапилляры сосудистой оболочки, развивающиеся сосуды собственно сетчатки (Mann, 1949) создают опасность повреждения сетчатки и хрусталика, вызываемого окислительным стрессом. Стекловидное тело, расположенное между сетчаткой и хрусталиком, является самым объемным внеклеточным матриксом глаза человека и является важной внутриглазной средой, обеспечивающей метаболические процессы в тканях глаза (Le Goff, Bishop, 2008). На ранних стадиях пренатального развития человека в стекловидном теле нами были обнаружены лютеин (Yakovleva *et al.*, 2007; Panova *et al.*, 2017), альбумин, альфа-фетопротеин (Panova, Tatikolov, 2011) и билирубин (Панова и др., 2020) – молекулы, обладающие свойствами антиоксидантов, которые, вероятно, обеспечивают защиту стекловидного тела и окружающих его тканей от окислительного стресса.

Ранее в стекловидном теле и жидкости передней камеры глаза травяной лягушки с применением метода импульсного лазерного фотолиза и рибофлавина в качестве акцептора электрона в триплетном состоянии, были обнаружены доноры электрона – тушители триплетного состояния рибофлавина (Panova *et al.*, 2008). Этим же методом можно оценить присутствие доноров электрона в стекловидном теле плодов человека. Следует учесть, что соединения–доноры электрона эффективно взаимодействуют со свободными радикалами, участвующими в процессах перекисного окисления и, таким образом, обладают свойствами антиоксидантов. Следовательно, данный метод можно использовать для оценки содержания антиоксидантов в биологических средах. В настоящей работе предложенный метод был применен для анализа стекловидного тела глаза человека в пренатальном развитии. Так как этот метод позволяет оценивать только суммарную концентрацию ан-

тиоксидантов, но не отдельные их молекулы, мы независимыми методами проанализировали содержание в стекловидном теле глаза плодов человека мочевой кислоты и катехоламинов, обладающих свойствами антиоксидантов. Кроме антиоксидантной функции, эти молекулы играют важную роль в метаболизме различных органов и тканей организма (Liu *et al.*, 1984; Shi *et al.*, 2003; Eisenhofer *et al.*, 2004; Webb *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010; Tovchiga, Shtrygol, 2014).

Важность стекловидного тела для пренатального развития тканей глаза определила цель настоящей работы – проанализировать содержание антиоксидантов в стекловидном теле глаза плодов человека по критерию электронодорных свойств – как тушителей триплетного состояния рибофлавина. Поскольку анализ литературы показал отсутствие данных по содержанию мочевой кислоты и катехоламинов в стекловидном теле в раннем пренатальном развитии человека, в работе также проанализировали эти молекулы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали стекловидное тело глаз плодов человека с 17 по 31 недель гестации. Возраст плодов соответствовал срокам, установленным врачом-акушером. Оценку содержания доноров электрона методом импульсного фотолиза проводили также для стекловидного тела взрослых глаз 23, 25, 41 и 48 лет.

Глазные яблоки, полученные при аутопсии, очищали от окружающих тканей и отмывали в нескольких сменах физиологического раствора (0.9% NaCl). Затем под бинокулярной лупой МБС-9 отрезали по лимбу роговицу и вынимали стекловидное тело вместе с хрусталиком, после чего аккуратно удаляли хрусталик и очищали стекловидное тело от остатков сетчатки. Полученные таким образом образцы стекловидного тела центрифугировали при 12 500 об./мин и 4°С в течение 30 мин. Надосадочную жидкость использовали в качестве образцов для исследования с помощью фотохимического зонда и для измерения концентрации мочевой кислоты.

Концентрацию мочевой кислоты измеряли на автоматическом биохимическом анализаторе BA-400, компании “BioSystems S.A.” (Испания). Измерения провели на 11 плодах с 17 по 31 нед.: 2 плода на 17 нед., 2 – на 19 нед., 2 – на 21 нед., 1 – на 23 нед., 2 – на 24 нед., 2 – на 31 нед. Анализировали образцы стекловидного тела, объединенные от обоих глаз одного плода. Для измерений с помощью фотохимического зонда объединяли надосадочную жидкость от двух плодов каждого возраста, оставшуюся после измерения концентрации мочевой кислоты.

Присутствие катехоламинов (норадреналина, адреналина, дофамина) определяли в стекловидном теле у двух плодов на сроках 17 и 18 нед. методом ВЭЖХ.

Оценка содержания антиоксидантов – эффективных доноров электрона. Оценку общего содержания молекул антиоксидантов, являющихся эффективными донорами электрона, в стекловидном теле проводили методом импульсного фотолиза с использованием рибофлавина, у двух плодов человека 24 и 31 недель и, для сравнения, у взрослых людей (по одному глазу для каждого возраста) 23, 25, 41 и 48 лет. Рибофлавин, являясь природным соединением (витамин B_2), обладает фотохимической активностью. В триплетном состоянии он отрывает электрон от различных доноров с образованием радикалов (Cardoso *et al.*, 2004, 2005). Это свойство позволяет использовать его в качестве фотохимического зонда для изучения содержания доноров электрона во внеклеточном матриксе.

Рибофлавин в качестве зонда растворяли в супернатантах стекловидного тела (в концентрации ~5×10^{-4} моль/л) и переводили в возбужденное триплетное состояние на установке лазерного импульсного фотолиза с возбуждением азотным лазером (337 нм, длительность вспышки 1 нс, энергия 0.8 мДж) (Levin *et al.*, 2005). Содержание доноров электрона в стекловидном теле оценивали по кинетике гибели триплетного состояния рибофлавина (спектр триплет-триплетного поглощения с λ_{abs}^{max} = 710 нм), который, как известно, эффективно тушится электроно-донорными соединениями (Cardoso *et al.*, 2004, 2005, 2012). Из этой кинетики (экспоненциальной, рис. 1, кривая *2*) были определены константы скорости гибели триплетного состояния рибофлавина в стекловидном теле (k_T) Точность определения значений k_T составляла ± 10%. Сравнение величин k_T с константой скорости гибели триплетного состояния рибофлавина в воде (k_0, рис. 1 кривая *1*) позволило оценить константы скорости тушения триплетного состояния рибофлавина донорами электрона, содержащимися в стекловидном теле, которые, в свою очередь, дали возможность оценки суммарной концентрации эффективных доноров электрона в стекловидном теле (табл. 1, см. ниже).

Все протоколы манипуляций с аутопсийным материалом человека одобрены комиссией по биоэтике ИБР РАН им. Н.К. Кольцова.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мочевая кислота была обнаружена в стекловидном теле плодов на всех исследованных стадиях (табл. 1). Не наблюдается закономерной зависимости концентрации мочевой кислоты от возраста плодов. Большая вариабельность данных, возможно, связана как с метаболизмом пуринов, так

и с питанием матери во время беременности, либо с малым количеством проанализированных глаз.

Кроме того, в стекловидном теле на стадиях 17 и 18 нед. были обнаружены катехоламины – норадреналин, адреналин и дофамин. Данные по катехоламинам носят качественный характер.

Информация о содержании электроно-донорных тушителей в стекловидном теле была получена путем сравнения кинетики гибели триплетного состояния рибофлавина в среде стекловидного тела с таковой в воде. Для этой цели мы использовали следующее выражение для константы скорости гибели триплетного состояния рибофлавина (Panova *et al.*, 2008):

$$k_T = k_0 + \Sigma k_{qi} c_i = k_0 + k_q \Sigma c_i, \quad (1)$$

где k_0 – константа скорости гибели триплетного состояния рибофлавина в отсутствие тушителей; k_{qi} и c_i – константы скорости тушения и соответствующие концентрации тушителей; k_q – константа скорости тушения, усредненная по большинству эффективных тушителей, присутствующих в системе (с учетом их концентрации).

Мы можем принять k_0 равным k_T в воде в отсутствие тушителей ($k_0 = 3.3 \times 10^5$ с$^{-1}$ (Panova *et al.*, 2008). Измерение кинетики гибели триплетного состояния рибофлавина в стекловидном теле у плодов 24 и 31 недель гестации дало значения k_T, равные (2.4–2.5) × 10^6 с$^{-1}$ (табл. 1). Для основных электронодонорных тушителей триплетного состояния рибофлавина, которые могут присутствовать в стекловидном теле, в литературе известны следующие значения k_q ($k_q \times 10^{-9}$, л моль$^{-1}$ с$^{-1}$): 2.9 для мочевой кислоты, 2.0 для аскорбата, 1.8 для триптофана, 1.4 для тирозина, 2.8 для катехоламинов (Cardoso *et al.*, 2004, 2005, 2007, 2012). Для контроля мы измерили значение k_q для тушения триплетного состояния рибофлавина мочевой кислотой в воде (3.1 × 10^9 л моль$^{-1}$ с$^{-1}$), которое оказалось близким к значению, приведенному выше. Соединения с более низкими константами скорости тушения (порядка 10^8 л моль$^{-1}$ с$^{-1}$ и менее, в частности, белки альбумин, лактоглобулин и лизоцим (Cardoso *et al.*, 2004, 2005, 2007, 2012)), вероятно,

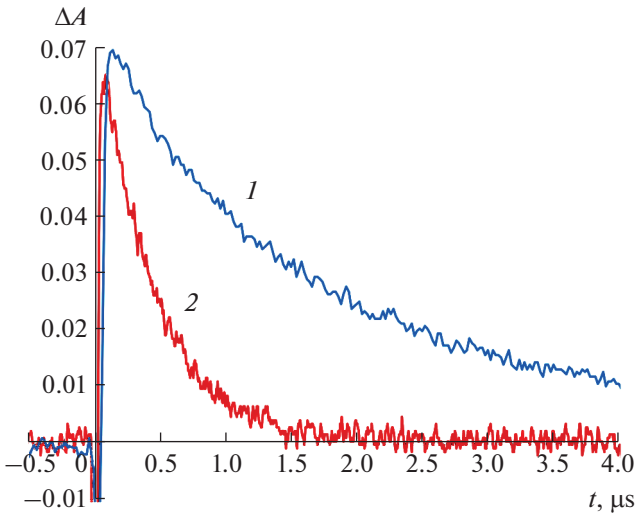


Рис. 1. Кинетические кривые гибели триплетного состояния рибофлавина (*1*) в воде и (*2*) в стекловидном теле плода 24 нед. гестации. Δ*A* – изменение поглощения; *t*, μs – время, мкс. Длина волны регистрации кинетических кривых 710 нм.

Таблица 1. Концентрация мочевой кислоты, константа скорости гибели триплетного состояния рибофлавина (k_T) и общая концентрация доноров электрона в стекловидном теле человека разных возрастов (в пренатальном развитии и взрослого человека)

	Возраст (число плодов или глаз)	Концентрация мочевой кислоты, мкмоль/л	$k_T \times 10^{-6}$, с$^{-1}$	Общая концентрация доноров электрона, мкмоль/л
Плод человека	17 нед (2 плода)	37; 136	н/а	н/а
	19 нед (2 плода)	79; 235	н/а	н/а
	22 нед (2 плода)	67; 104	н/а	н/а
	23 нед (1 плод)	64	н/а	н/а
	24 нед (2 плода)	142; 248	2.5	~990 (>700)
	31 нед (2 плода)	79; 80	2.4	~940 (>690)
Взрослый человек	23 года (1 глаз)	н/а	3.3	~1400 (>990)
	25 лет (1 глаз)	н/а	5.6	~2400 (>1800)
	41 год (1 глаз)	н/а	6.0	~2600 (>1900)
	48 лет (1 глаз)	н/а	7.6	~3300 (>2400)

Примечание. н/а – не анализировали.

не вносят существенного вклада в процесс тушения. Было показано, что каротиноиды, которые также присутствуют в стекловидном теле (Yakovleva *et al.*, 2007; Panova *et al.*, 2017), не тушат триплетное состояние рибофлавина (Cardoso *et al.*, 2004, 2005, 2007, 2012). Мы также показали, что такие компоненты стекловидного тела, как гиалуроновая кислота и коллаген, не тушат триплетное состояние рибофлавина (Panova *et al.*, 2008). Целесообразно учитывать только наиболее активные триплетные тушители с $k_q \geq 1 \times 10^9$ л моль$^{-1}$ с$^{-1}$ (в частности, 5 соединений, указанных выше). Если принять для k_q в качестве грубого приближения усредненное значение 2.2×10^9 л моль$^{-1}$ с$^{-1}$, то из соотношения (1) можно оценить общую концентрацию эффективных тушителей-антиоксидантов Σc_i (~1000 мкмоль/л, (табл. 1); если принять для k_q максимальное значение 3×10^9 л моль$^{-1}$ с$^{-1}$, Σc_i будет не менее 700 мкмоль/л, что является нижней границей оценки содержания антиоксидантов в стекловидном теле). Поскольку измеренная нами максимальная концентрация мочевой кислоты в стекловидном теле составляла 248 мкмоль/л (для плодов 24 нед. гестации, (табл. 1), содержание других эффективных тушителей в стекловидном теле у плодов 24 недель гестации можно определить по разности: 990 – 248 = 742 мкмоль/л (не менее 700 – 248 = 452 мкмоль/л). Еще более высокое содержание других эффективных триплетных тушителей можно ожидать в стекловидном теле плодов 31 недель гестации (по разности 940 – 80 = 860 мкмоль/л), с учетом содержания мочевой кислоты в нем ~80 мкмоль/л (табл. 1).

Для сравнения были проведены измерения кинетики гибели триплетного состояния рибофлавина в стекловидном теле взрослых людей, которые дали еще большие значения k_T (табл. 1). Наблюдается тенденция к увеличению концентрации доноров электрона с возрастом человека (что требует дополнительного исследования). Это может означать накопление эффективных антиоксидантов в стекловидном теле, возможно, связанное с возрастной перестройкой матрикса стекловидного тела.

Таким образом, концентрация мочевой кислоты в стекловидном теле плодов человека демонстрирует большую вариабельность (от 37 до 248 мкмоль л$^{-1}$), и не наблюдается какой-либо возрастной зависимости концентрации. В стекловидном теле у взрослых людей содержание мочевой кислоты также варьирует в широких пределах – от 77.38 до 452.00 мкмоль/л (Kałuzny, Raukuć, 1996). В то же время, полученные данные указывают на то, что стекловидное тело плодов человека, наряду с мочевой кислотой, содержит и другие эффективные антиоксиданты (эффективные тушители триплетного состояния рибофлавина) с общей концентрацией, которая может существенно превышать концентрацию мочевой кислоты. В частности, такими антиоксидантами могут быть катехоламины (Shimizu *et al.*, 2010; Tovchiga, Shtrygol, 2014; Шилов, Иванютин, 2014), присутствие которых было обнаружено в стекловидном теле плодов человека в настоящей работе, и аскорбиновая кислота, которая была обнаружена в стекловидном теле у плодов человека в работе Сен с соавт. (*Sen et al.*, 1983). Присутствие катехоламинов (Hervet *et al.*, 2016), аскорбиновой кислоты, триптофана и ряда других антиоксидантов (Ankamah *et al.*, 2020) также было показано в стекловидном теле глаз взрослого человека.

Из многочисленных функций мочевой кислоты и катехоламинов мы сделали акцент на их антиоксидантных свойствах, поскольку антиоксидантная защита является важной составляющей в развитии глаза, обеспечивающей защиту сетчатки, хрусталика и самого стекловидного тела от окислительного стресса. В то же время все обнаруженные нами антиоксиданты в стекловидном теле являются биологически активными молекулами и могут участвовать в регуляции пролиферации и дифференцировки сетчатки и хрусталика. Так, мочевая кислота присутствует в жидких средах и тканях организма и помимо антиоксидантной функции служит показателем ряда патологических состояний органов и тканей, таких как подагра, гиперурикемия, артрит, сердечно-сосудистая и почечная недостаточность (Ames *et al.*, 1981; Alvarez-Lario, Macarron-Vicente, 2010). Она является одним из главных эндогенных сигналов опасности при повреждении клеток, приводящем к стимуляции иммунной системы путем активации Т-клеток (Shi *et al.*, 2003; Webb *et al.*, 2009).

Важными молекулами, присутствующими в организме, являются и катехоламины (дофамин, норадреналин и адреналин). Они занимают ключевую позицию в регуляции физиологических процессов (Eisenhofer *et al.*, 2004). Катехоламины хорошо исследованы в сетчатке глаза млекопитающих. Дофамин и адреналин присутствуют в амакриновых нейронах, которые участвуют в зрительном процессе. Норадреналин присутствует в симпатических нервах, которые иннервируют сосуды сетчатки (Hodjiconstaintinou, Neff, 1984; Максимова, 2008). В последнее время появляются данные об участии катехоламинов – дофамина и норадреналина в регуляции ангиогенеза при ретинопатии недоношенных (Катаргина и др., 2019).

Следует сказать, что некоторые молекулы-антиоксиданты, также присутствующие в стекловидном теле, не являются эффективными тушителями триплетного состояния рибофлавина и, таким образом, не входят в оценку, полученную методом тушения триплетного состояния рибофлавина. К ним, в частности, относится лютеин – каротиноид, обнаруженный нами в стекловидном теле плодов

человека на ранних стадиях развития (Yakovleva *et al.*, 2007; Panova *et al.*, 2017).

Полученные данные позволили расширить наше представление о молекулах стекловидного тела, обладающих антиоксидантными свойствами, в пренатальном развитии глаза человека. Оценка содержания антиоксидантов по критерию тушения триплетного состояния рибофлавина показала достаточно высокую их концентрацию в стекловидном теле как плодов, так и взрослого человека (не менее 700–1000 мкмоль/л). Содержание антиоксидантов в системе развивающегося глаза, обеспечивающее его редокс-статус, является важным показателем нормы и патологии глаза и существенно для интерпретации заболеваний глаз у новорожденных и принятия терапевтических, либо хирургических подходов к лечению.

Авторы выражают благодарность Р.А. Полтавцевой (НМИЦ АГиП им. В.И. Кулакова) и М.Д. Чибиревой (ИБР РАН) за помощь в работе.

Работа выполнена И.Г. Пановой в рамках раздела ГЗ ИБР РАН 2021 года (0088-2021-0017) и А.С. Татиколовым и П.П. Левиным в рамках раздела ГЗ ИБХФ РАН (001201253314).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Катаргина Л.А., Осипова Н.А., Панова А.Ю., Бондаренко Н.С., Никишина Ю.О., Муртазина А.Р., Угрюмов М.В. Изучение патогенетического значения катехоламинов в развитии ретинопатии недоношенных на экспериментальной модели заболевания // Рос. офтальмол. журн. 2019. Т. 12. № 4. С. 64–69.

Максимова Е.М. Нейромедиаторы сетчатки и перестройки в нервных слоях сетчатки при дегенерации фоторецепторов // Сенсорные системы. 2008. Т. 22. № 1. С. 36–51.

Панова И.Г., Сухова Ю.В., Татиколов А.С., Иванец Т.Ю. Билирубин в стекловидном теле глаза плодов человека // Бюллетень эксперимен. биологии и медицины. 2020. Т. 170. № 7. С. 118–120.

Шилов Г.Н., Иванютин В.А. Антиоксидантная активность катехоламинов, как одно из звеньев их антистрессорного эффекта // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2014. Т. 12. № 2. С. 43–46.

Álvarez-Lario B., Macarrón-Vicente J. Uric acid and evolution // Rheumatology (Oxford). 2010. V. 49. P. 2010–2015.

Ames B.N., Cathcart R., Schwiers E., Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 6858–6862.

Ankamah E., Sebag J., Ng E., Nolan J.M. Vitreous antioxidants, degeneration, and vitreo-retinopathy: exploring the links // Antioxidants. 2020. V. 9. P. 7.

Cardoso D.R., Franco D.W., Olsen K., Andersen M.L., Skibsted L.H. Reactivity of bovine whey proteins, peptides, and amino acids toward triplet riboflavin as studied by laser flash photolysis // J. Agric. Food Chem. 2004. V. 52. P. 6602–6606.

Cardoso D.R., Homem-de-Mello P., Olsen K., da Silva A.B.F., Franco D.W., Skibsted L.H. Deactivation of triplet-excited riboflavin by purine derivatives: important role of uric acid in light-induced oxidation of milk sensitized by riboflavin // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. P. 3679–3684.

Cardoso D.R., Olsen K., Skibsted L.H. Mechanism of deactivation of triplet-excited riboflavin by ascorbate, carotenoids, and tocopherols in homogeneous and heterogeneous aqueous food model systems // J. Agric. Food Chem. 2007. V. 55. P. 6285–6291.

Cardoso D.R., Libardia S.H., Skibsted L.H. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality // Food Funct. 2012. V. 3. P. 487–502.

Eisenhofer G., Kopin I.J., Goldstein D.S. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine // Pharmacol. Rev. 2004. V. 56. P. 331–349.

Hervet T., Teresin'ski G., Hejna P., Descloux E., Grouzmann E., Palmiere C. Catecholamines and their O-methylated metabolites in vitreous humor in hypothermia cases // Forensic Sci. Med. Pathol. 2016. V. 12. P. 163–169.

Hodjiconstaintinou M., Neff N.H. Catecholamine system of retina: a model for studying synaptic mechanisms // Life Sciences. 1984. V. 35. P. 1135–1147.

Kałuzny J.J., Raukuć D. Uric acid level in human aqueous and vitreous humor // Klin. Oczna. 1996. V. 98. P. 267–270.

Le Goff M.M., Bishop P.N. Adult vitreous structure and postnatal changes // Eye (London). 2008. V. 22. P. 1214–1222.

Levin P.P., Sul'timova N.B., Chaikovskaya O.N. Kinetics of fast reactions of triplet states and radicals under photolysis of 4,4'-dimethylbenzophenone in the presence of 4-halophenols in micellar solutions of sodium dodecyl sulfate in magnetic field // Russ. Chem. Bull. 2005. V. 54. P. 1433–1438.

Liu K-M., Swann D., Lee P., Lam K.-W. Inhibition of oxidative degradation of hyaluronic acid by uric acid // Current Eye Research. 1984. V. 3. P. 1049–1053.

Mann I. The development of the human eye. London: Brit. Med. Assoc. 1949. 313 p.

Panova I.G., Tatikolov A.S. Investigation of the content of alpha-fetoprotein and serum albumin in the vitreous body of the eye of human embryos // Biol. Bull. 2011. V. 38. P. 191–194.

Panova I.G., Sharova N.P., Dmitrieva S.B., Levin P.P., Tatikolov A.S. Characterization of the composition of the aqueous humor and the vitreous body of the eye of the frog *Rana temporaria* L. // Comp. Biochem. Physiol. Part A. 2008. V. 151. P. 676–681.

Panova I.G., Yakovleva M.A., Tatikolov A.S., Kononikhin A.S., Feldman T.B., Poltavtseva R.A., Nikolaev E.N., Sukhikh G.T., Ostrovsky M.A. Lutein and its oxidized forms in eye structures throughout prenatal human development // Exp. Eye Res. 2017. V. 160. P. 31–37.

Sen A., Roy R., Mukherjee K.L. Ascorbic acid concentration in developing human fetal vitreous humor. Indian J. Ophthalmol. 1983. V. 31. № 2. P. 73–74.

Shi Y., Evans J.E., Rock K.L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells // Nature. 2003. V. 425. P. 516–521.

Shimizu T., Nakanishi Y., Nakahara M., Wada N., Morooka Y., Hirano T., Konishi T., Matsugo S. Structure effect on antioxidant activity of catecholamines toward singlet oxygen and other reactive oxygen species *in vitro* // J. Clin. Biochem. Nutr. 2010. V. 47. P. 181–190.

Sies H., Berndt C., Jones D.P. Oxidative stress // Annu. Rev. Biochem. 2017. V. 86. P. 715–748.

Tovchiga O.V., Shtrygol S.Yu. Uric acid and central nervous system functioning (a literature review) // Biol. Bulletin Reviews. 2014. V. 4. P. 210–221.

Webb R., Jeffries M., Sawalha A.H. Uric acid directly promotes human T-cell activation // Am. J. Med. Sci. 2009. V. 337. P. 23–27.

Yakovleva M.A., Panova I.G., Feldman T.B., Zak P.P., Tatikolov A.S., Sukhikh G.T., Ostrovsky M.A. Finding of carotenoids in the vitreous body of human eye during prenatal development // Russ. J. Dev. Biol. 2007. V. 38. P. 317–321.

Yang Z., Xiaohua W., Lei J., Ruoyun T., Mingxia X., Weichun H., Li F., Ping W., Junwei Y. Uric acid increases fibronectin synthesis through upregulation of lysyl oxidase expression in rat renal tubular epithelial cells // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 2010. V. 299. P. 336–346.

Antioxidants in the Vitreous Body of Human Eye Fetuses

I. G. Panova[1, #], Yu. V. Sukhova[2], A. S. Tatikolov[3], P. P. Levin[3], and T. Yu. Ivanets[2]

[1]*Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova, 26, Moscow, 119334 Russia*

[2]*National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia, ul. Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997 Russia*

[3]*Emanuel Institute of Biochemical Physics, RAS, ul. Kosygina, 4, Moscow, 119334 Russia*

[#]*e-mail: pinag@mail.ru*

Using the method of laser photolysis, the presence of electron donor antioxidants has been shown and their total content (not less than 700–1000 μmol/L) in the vitreous body of the human eye in early prenatal development has been estimated. In the vitreous body, the concentration of uric acid has been determined and the presence of catecholamines (dopamine, noradrenaline, adrenaline) – antioxidants with electron-donor properties, has been shown. The content of antioxidants in the system of the developing eye, which ensures its redox status, is an important indicator for assessing the normal state and pathology of the eye and is essential for predicting and interpreting eye diseases in newborns and adequate approaches to their treatment.

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 6, с. 594–601

БИОХИМИЯ

УДК 597.553.2.591.05

РАЗЛИЧИЕ СОДЕРЖАНИЯ ИОНОВ В КРОВИ У КУМЖИ *Salmo trutta* ИЗ ДВУХ БЛИЗКОРАСПОЛОЖЕННЫХ РЕК ДО СМОЛТИФИКАЦИИ

© 2021 г. Е. Д. Павлов*, @, Е. В. Ганжа*, Д. С. Павлов*

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

@E-mail: p-a-v@nxt.ru

Поступила в редакцию 09.03.2021 г.
После доработки 27.03.2021 г.
Принята к публикации 27.03.2021 г.

Проведено сравнение содержания ионов Cl^-, Ca^{2+}, Na^+ и K^+ в крови кумжи *Salmo trutta* из двух рек бассейна Ладожского озера – Алатсоя и Улмасенйоки. Концентрация Cl^- и Ca^{2+} в крови рыб различается и коррелирует с содержанием хлоридов и гидрокарбонатов в реках. Уровень Na^+ (у рыб в обеих реках) и Cl^- (у рыб в р. Улмасенйоки) повышается к возрасту особей 2+, в дальнейшем (в возрасте ≥3+) практически не меняется. Выявлен половой диморфизм по концентрации K^+ в крови – у самок содержание этого иона на 13% выше, чем у самцов. У самок в возрасте 1+ в р. Улмасенйоки содержание K^+ заметно выше, чем у самок того же возраста в р. Алатсоя. Предполагается, что, наряду с другими факторами, изменения ионного состава у кумжи за полгода до смолтификации может определять степень их подготовки к покатной миграции.

Ключевые слова: кумжа *Salmo trutta*, осморегуляция, ионы крови, реки Фенноскандии

DOI: 10.31857/S1026347021060147

Многим лососевым свойственна внутрипопуляционная дифференциация, при которой особи выбирают резидентную или анадромную жизненные стратегии, формирующиеся в ранний период развития рыб (Jonsson, Jonsson, 2011, 2014; Ferguson *et al.*, 2019). Кумжа *Salmo trutta* обитает во многих реках Фенноскандии и характеризуется разнообразием условий обитания, которые во многом определяют жизненный цикл и физиологическое состояние рыб, а также долю проходных особей в популяции (Northcote, 1984; Lucas, Baras, 2001; Jonsson, Jonsson, 2011, 2018; Huusko *et al.*, 2018).

Способность к модификации осморегуляции является одним из механизмов реализации у особей проходной жизненной стратегии (McCormick, 2001; Jonsson, Jonsson, 2011; Zydlewski, Wilkie, 2012; Ferguson *et al.*, 2019). На примере черноморской кумжи *Salmo trutta labrax* показано, что у смолтов изменение концентрации ионов происходит еще в пресной воде – повышаются Na^+ и Ca^{2+} в крови, а K^+ и Cl^- снижается (Павлов и др., 2017). На данный момент неизвестно, за какое время до смолтификации наступают изменения в осморегуляции у проходной кумжи *Salmo trutta*. Есть гипотеза (Thorpe *et al.*, 1998) о том, что подготовка к смолтификации у атлантического лосося *Salmo salar* начинается в конце лета, предшествующего последующей весенней покатной миграции смолтов, т.е. более чем за 6 мес. до смолтификации. Гетерогенность условий обитания в период, предшествующий смолтификации, связана с долей мигрантов в популяции (Thorpe *et al.*, 1987). Кумжа, как и многие другие лососевые (Груздева и др., 2017), способна смолтифицироваться в разном возрасте (чаще в 2–3 года) (L'Abée-Lund *et al.*, 1989; Jonsson, L'Abée-Lund, 1993; Jonsson *et al.*, 2001), что предполагает возможность модификации ионного состава крови у рыб на протяжении всей жизни в пресной воде. Ранее нами установлено (Павлов, Павлов, 2018), что кумжа из разных водоемов бассейнов Ладожского и Онежского озер, различается по уровню ионов. Однако остается до конца неясно, насколько велика степень изменчивости ионного состава крови у кумжи из разных рек, разного возраста и биологического состояния.

Цель работы – сравнить уровень Cl^-, Ca^{2+} Na^+ и K^+ в крови кумжи разного возраста за полгода до смолтификации из двух близкорасположенных рек Фенноскандии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проведена в августе 2019 г. на рыбах, отловленных в двух реках, относящихся к бассейну Ладожского озера – р. Алатсоя и р. Улмасенйоки

Рис. 1. Схема озерно-речной системы: *1* – районы работ, *2* – плотины.

(рис. 1). Река Улмасенйоки имеет протяженность всего 2.7 км, а ее истоком является озеро Суйстамонъярви (61°53′36.3″ N 31°08′12.2″ E). Эта река впадает в более крупное озеро Янисъярви, соединяющееся через р. Янисйоки с Ладожским озером. Длина реки Алатсоя составляет 14 км, а ее истоком является оз. Алатунлампи (http://textual.ru/gvr), которое находится в 5 км на юго-запад от оз. Суйстамонъярви (61°52′30.8″ N 31°03′01.8″ E). Таким образом, истоки двух рек расположены рядом друг с другом, но не соединены между собой. Река Алатсоя впадает в р. Янисъйоки в среднем течении. На реке Янисъйоки расположены две плотины, не имеющие рыбохода и блокирующие возврат производителей кумжи из озера на нерест в реки Улмасенйоки и Алатсоя. Тем не менее, в реках бассейнов Ладожского озера часть молоди кумжи смолтифицируется, выбирая проходную жизненную стратегию (Павлов, Павлов, 2018). Смолтификация и покатная миграция кумжи в северной части ареала, как правило, происходит в апреле–мае (Rasmussen, 1986; Bohlin *et al.*, 1993). Период проведения работ был выбран такой, когда смолты (под термином “смолт” понимается особь, совершающая покатные миграции независимо от конечного пункта этих миграций – река, озеро, море (Jones *et al.*, 2015; Huusko *et al.*, 2018; Ferguson *et al.*, 2019)) кумжи в исследованных реках отсутствуют (за полгода до смолтификации). Это позволяет оценить неоднородность рыб по ионному составу задолго до подготовки смолтов к покатной миграции.

Для оценки гидрохимии исследованных водоемов в начале сентября (через две недели после отлова рыб) с помощью портативного многопараметрового прибора WTW Multi 3620 Set G были определены температура воды, pH, общая масса растворенных примесей (TDS), окислительно-восстановительный потенциал (ОВП, U), проводимость ($\varkappa$), удельное электрическое сопротивление (ρ). Уровень ионов Na^+, K^+, Ca^{2+}, гидрокарбонатов и хлоридов в воде определяли в Центре лабораторного анализа и технических измерений по Республике Карелия (ЦЛАТИ по Республике Карелия, г. Петрозаводск) с помощью спектрометра эмиссионного с индуктивно связанной плазмой Optima 7000DV и ионного хроматографа “Стайер”.

Кумжа отловлена с помощью электролова Fa-2 (Норвегия). В период исследования встречались молодь (пестрятки) и половозрелые особи в возрасте ≥1+. Все пестрятки и половозрелые особи в возрасте 1+ имеют окраску серого цвета с оливковым оттенком и ярко выраженные черные поперечные полосы по бокам тела. Окраска половозрелой кумжи старшего возраста (≥3+) оливковая с темным оттенком на дорзальной стороне тела до светлого на вентральной. По всему телу яркие красные пятна чередуются с небольшими черными пятнами неправильной формы. В течение часа после поимки рыб перевозили в лабораторию в аэрируемом баке, объемом 100 л (плотность посадки ≤300 экз./м^3). Перевозку осуществляли в воде из того же водоема, в котором были пойманы рыбы.

В течение 3-х часов после поимки у рыб прижизненно отбирали кровь из хвостовой вены за анальным плавником шприцом объемом 1 мл (объем пробы в зависимости от размера особи варьировал от 100 до 300 мкл). Концентрацию Cl^-, Ca^{2+}, Na^+ и K^+ определяли индивидуально (для каждой особи) в цельной крови непосредственно после ее отбора портативным прибором Abbot i-STAT 1 (“Abbott Point-of-Care Inc.”) с набором одноразовых картриджей CHEM 8+. У особей измеряли длину по Смиту (*L*) и массу (*W*) тела, определяли пол (по морфологическому строению половых желез при вскрытии), возраст (по чешуе) и стадию зрелости половых желез (Макеева, 1992): II-я стадия у молоди, III–IV-я – у половозрелых рыб.

Всего выловлено и проанализировано 83 экз. рыб, из них 42 экз. из р. Алатсоя и 41 экз. из р. Улмасенйоки. Статистическая обработка материала выполнена по индивидуальным и обобщенным показателям, совокупность значений в выборках соответствует нормальному распределению – $p > 0.05$ (Колмогоров-Смирнов). Малые реки Республики Карелия, как правило, характеризуются низкой численностью кумжи (Веселов и др.,

Таблица 1. Физико-химические показатели воды в исследованных реках

Показатель	р. Алатсоя	р. Улмасенйоки
Температура, °C	13.0	8.5
Ph	6.719	7.021
Na^+, мг/дм^3	0.98 ± 0.23	<0.5
K^+, мг/дм^3	0.21 ± 0.05	0.2 ± 0.05
Ca^{2+}, мг/дм^3	3.2 ± 0.5	3.8 ± 0.6
Гидрокарбонаты, мг/дм^3	58 ± 6	43 ± 6
Хлориды, мг/дм^3	1.85 ± 0.28	7.0 ± 1.0
Общая масса растворенных примесей (TDS), мг/л	37	33
Окислительно-восстановительный потенциал (ОВП, U), мВ	12.7–22.8	0.2–1.4
Электропроводность ($\varkappa$), мкСм/см	37	32.7

Примечание. Пределы варьирования указаны только для показателей, определенных в ЦЛАТИ по Республике Карелия, Петрозаводск (за счет проведения 3-х повторных количественных определений каждого из показателей.

2016). Принимая во внимание ограниченность выборки, был проведен дисперсионный анализ (ANOVA) для оценки связи содержания ионов в крови кумжи с принадлежностью особи к конкретной реке, ее возрастом и полом. Использован коэффициент корреляции Пирсона, *t*-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Физико-химические показатели рек. Исследуемые реки различаются по ряду физико-химических показателей (табл. 1). Температура воды в р. Улмасенйоки заметно ниже, чем в Алатсоя, за счет впадения родника в ее нижнем течении. Общая минерализация (TDS) в реках низкая, не превышает 37 мг/л, что обуславливает низкую электропроводность воды и высокое ее удельное электрическое сопротивление, затрудняющие отлов кумжи электроловом. Наибольший вклад в общую минерализацию вносят неорганические соли (бикарбонаты, хлориды и сульфаты кальция, калия и натрия), а также небольшое количество органических веществ. Исследованные реки характеризуются положительным окислительно-восстановительным потенциалом. Вода в р. Улмасенйоки имеет низкую концентрацию Na^+ и высокую концентрацию хлоридов. Высокое удельное электрическое сопротивление воды в р. Улмасенйоки обусловлено не только ее низкой минерализацией, но и низкой температурой воды.

Возрастная структура и биологические показатели кумжи. В реках были отловлены пестрятки (57 экз.) и половозрелые особи (26 экз.). Половозрелые особи в р. Алатсоя были представлены только самцами, возраст которых соответствовал возрасту пестряток (табл. 2). В р. Улмасенйоки половозрелые самки и самцы были старше пестряток.

Однофакторный дисперсионный анализ показал, что длина и масса тела пестряток в возрасте 1+ в р. Улмасенйоки заметно (почти в 2 раза по массе), выше ($p < 0.001$ по *t*-критерию Стьюдента), чем у пестряток из р. Алатсоя; к возрасту 2+ различия нивелируются ($p > 0.05$).

Уровень Cl^-, Ca^{2+}, Na^+ и K^+ в крови кумжи. Концентрация ионов в крови кумжи представлена в табл. 3. У пестряток самок в возрасте 1+ из р. Улмасенйоки уровень K^+ значительно выше, чем у пестряток самцов 1+ из той же реки и пестряток самок 1+ из р. Алатсоя (соответственно $p = 0.001$ и $p = 0.01$ по *t*-критерию Стьюдента). Концентрация Cl^- в крови пестряток самцов 1+ из р. Алатсоя ниже, чем у особей той же группы из р. Улмасенйоки. Другие различия не выявлены ($p > 0.05$).

Дисперсионный анализ показал, что кумжа из двух рек различается только по содержанию двух ионов – Ca^{2+} и Cl^- (табл. 4). Концентрация в крови двух других ионов (Na^+ и K^+) одинакова у рыб из двух рек ($p > 0.05$). Концентрация ионов Cl^- и Na^+, связана с возрастом рыб. Содержание K^+ в крови кумжи связано только с полом особи.

У рыб старшего возраста (≥2+) из р. Алатсоя уровень Cl^- в крови заметно ниже ($p = 0.003$ здесь и далее по *t*-критерию Стьюдента), чем у особей из р. Улмасенйоки (рис. 2). Достоверные различия ($p = 0.018$) по концентрациям Cl^- получены только между рыбами из р. Улмасенйоки в возрасте 1+ и особями старшего возраста (≥2+); у кумжи из р. Алатсоя прослеживается сходная тенденция. Концентрация Ca^{2+} выше у рыб из р. Алатсоя по сравнению с кумжей из р. Улмасенйоки (рис. 3). Высокий уровень Cl^- у рыб старшего возраста (≥2+) и Ca^{2+} у разновозрастных особей из рр. Алатсоя и Улмасенйоки соответствует повышенному содержанию хлоридов (7.0 против 1.85 мг/дм^3) и

Таблица 2. Возрастная структура и биологические показатели кумжи *Salmo trutta* из рр. Алатсоя и Улмасенйоки

Река	Группа и возраст	*FL*, см	*W*, г	*n*, экз.
Алатсоя	Пестрятки 1+	12.4 ± 0.12 / 10.9–13.3	21.8 ± 0.60 / 15.4–26.6	25
	Пестрятки 2+	17.3 ± 0.53 / 14.9–19.3	56.5 ± 5.16 / 36.7–76.5	7
	Половозрелые особи 1+...2+	17.0 ± 0.71 / 12.9–19.6	61.6 ± 6.20 / 25.6–84.5	10
Улмасенйоки	Пестрятки 1+	15.5 ± 0.30 / 12.8–18.2	40.9 ± 2.45 / 20.5–61.5	17
	Пестрятки 2+	18.9 ± 0.61 / 15.5–20.1	70.9 ± 6.03 / 43.1–87.9	8
	Половозрелые особи 3+...6+	29 ± 1.6 / 21–47	263 ± 46.8 / 96–820	16

гидрокарбонатов (58 против 43 мг/дм^3) в воде исследованных рек.

Уровни ионов Na^+ повышаются в крови кумжи к возрасту 2+, в дальнейшем (возраст ≥3) концентрация этих ионов у особей заметно не меняется ($p > 0.05$) (рис 4). В крови самок уровень K^+ выше, чем у самцов (рис. 5).

В крови кумжи выявлена положительная корреляция между концентрациями ионов Cl^- и Na^+ (0.71, $p < 0.001$), Cl^- и Ca^{2+} (0.55, $p < 0.001$) и отрицательная – между Na^+ и K^+ (–0.46, $p < 0.001$), Cl^- и K^+ (–0.38, $p < 0.01$). Не установлено корреляции уровня ионов с длиной и массой тела у пестряток из двух рек в возрасте 1+. Уровень Cl^- в крови пестряток 2+ коррелирует с их длиной и массой тела (соответственно 0.76 и 0.70 при $p < 0.01$). У особей старшего возраста (≥3+) содержание K^+ также коррелирует с длиной и массой тела (соответственно 0.40 и 0.51 при $p < 0.05$).

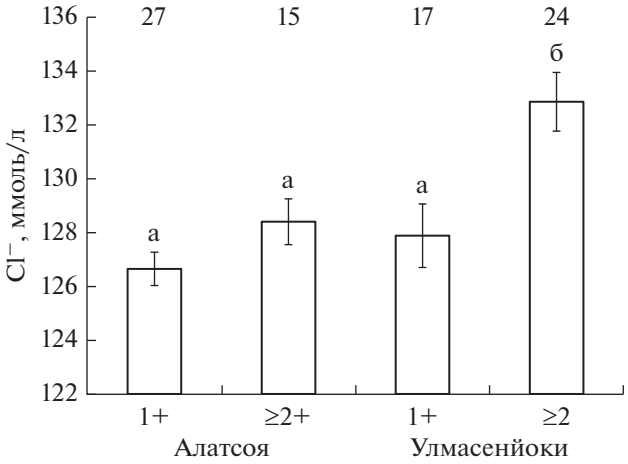


Рис. 2. Концентрация Cl^- в крови кумжи *Salmo trutta* в возрасте 1+ и ≥2+ из двух близкорасположенных рек. Различия достоверны между а и б по *t*-критерию Стьюдента ($p < 0.05$). Рис. 2–5 построены по суммарным выборкам рыб на основании данных из табл. 4 – уровень каждого иона оценен по достоверным различиям ($p > 0.05$). Здесь и на рис. 3–5 (|) – ошибка средней, цифры над столбиками – число экз. (*n*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что уровень ионов в крови рыб зависит как от условий среды обитания (гидрохимический

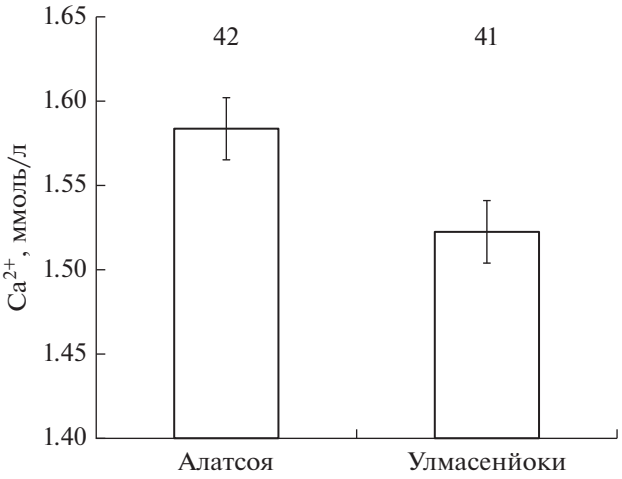


Рис. 3. Концентрация Ca^{2+} в крови кумжи *Salmo trutta* из рр. Алатсоя и Улмасенйоки. Здесь и на рис. 4–5 различия между столбцами достоверны по ANOVA ($p < 0.05$).

Таблица 3. Концентрация Cl^-, Ca^{2+}, Na^+ и K^+ в крови кумжи *Salmo trutta*, ммоль/л

Группа и возраст	Пол	Cl^-	Ca^{2+}	Na^+	K^+	*n*, экз.
р. Алатсоя						
Пестрятки 1+	♀	127 ± 0.91 / 19–130	1.56 ± 0.034 / 1.40–1.77	143 ± 1.0 / 137–147	4.4 ± 0.21 / 3.6–5.6	12
	♂	126 ± 0.91 / 21–131	1.62 ± 0.026 / 1.47–1.80	144 ± 0.6 / 141–148	4.2 ± 0.19 / 2.9–5.1	13
Пестрятки 2+	♀	130 ± 1.41 / 24–134	1.58 ± 0.036 / 1.40–1.63	146 ± 0.7 / 144–148	4.1 ± 0.31 / 3.4–5.5	6
	♂	123	1.45	141	3.5	1
Половозрелые особи 1+...2+	♂	128 ± 0.91 / 24–132	1.56 ± 0.024 / 1.47–1.70	145 ± 1.0 / 140–150	4.3 ± 0.16 / 3.5–5.1	10
р. Улмасенйоки						
Пестрятки 1+	♀	127 ± 1.81 / 15–135	1.49 ± 0.050 / 1.25–1.66	141 ± 1.4 / 133–147	5.5 ± 0.16 / 4.4–7.3	10
	♂	130 ± 1.01 / 27–133	1.45 ± 0.038 / 1.33–1.57	143 ± 1.0 / 141–149	4.1 ± 0.17 / 3.4–4.7	7
Пестрятки 2+	♀	135 ± 1.0 / 134–137	1.62 ± 0.040 / 1.57–1.70	146 ± 0.31 / 45–146	4.4 ± 0.49 / 3.5–5.2	3
	♂	132 ± 2.7 / 123–140	1.51 ± 0.065 / 1.27–1.63	146 ± 1.7 / 142–150	4.1 ± 0.29 / 3.2–4.9	5
Половозрелые особи 3+...6+	♀	132 ± 2.0 / 126–136	1.54 ± 0.061 / 1.31–1.77	147 ± 1.5 / 142–153	4.8 ± 0.37 / 3.7–6.6	7
	♂	133 ± 2.1 / 121–139	1.53 ± 0.052 / 1.40–1.77	147 ± 1.9 / 136–156	4.1 ± 0.35 / 3.1–6.1	9

Таблица 4. Уровни значимости (*p*) зависимости концентрации ионов Cl^-, Ca^{2+}, Na^+ и K^+ в крови кумжи *Salmo trutta* (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA) от возраста, пола и принадлежности рыб к реке. Выделены значения $p < 0.05$

	Cl^-	Ca^{2+}	Na^+	K^+
Река	**0.001/0.018**	**0.035/0.040**	0.600/0.403	0.131/0.078
Возраст	**0.014/0.005**	0.146/0.630	**0.019/0.003**	0.162/0.088
Пол	0.782/0.560	0.780/0.711	0.583/0.767	**0.005/0.017**

Примечание. В числителе – оценка проведена по всем исследованным особям, в знаменателе – только по пестряткам.

состав воды), так и от возраста и пола особи. Рассмотрим специфику выявленных зависимостей.

Концентрации Cl^- и Ca^{2+} в крови у кумжи из рек Алатсоя и Улмасенйоки различаются, что, по всей видимости, обусловлено различиями в химическом составе воды в этих реках. Так, низкий уровень Cl^- в крови кумжи из р. Алатсоя по сравнению с особями из р. Улмасенйоки соответствует пониженному (в 3.8 раза) содержанию хлоридов в воде р. Алатсоя. В то же время высокий уровень Ca^{2+} в крови рыб соответствует повышенному содержанию гидрокарбонатов в р. Алатсоя. Эти результаты согласуются с нашим предположением (Павлов, Павлов, 2018), что различия количественного содержания ионов в крови рыб могут быть связаны с гидрохимией рек. На наличие такой связи обращали внимание и другие исследователи (Evans, 1980; Laurent, Hebibi, 2011).

Концентрация Na^+ в крови кумжи из двух рек практически не различается несмотря на то, что

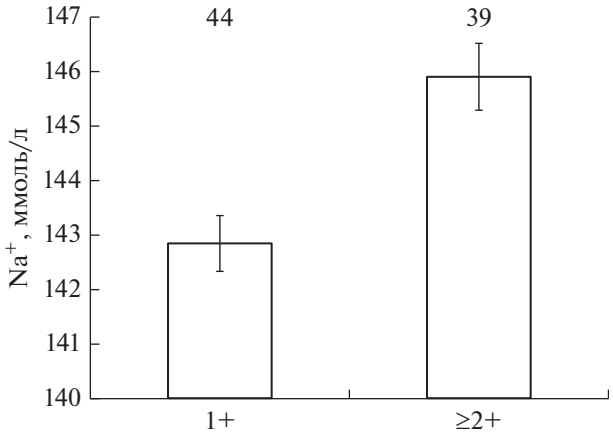


Рис. 4. Концентрации Na^+ в крови кумжи *Salmo trutta* в возрасте 1+ и ≥2+ из двух близкорасположенных рек (рр. Алатсоя и Улмасенйоки).

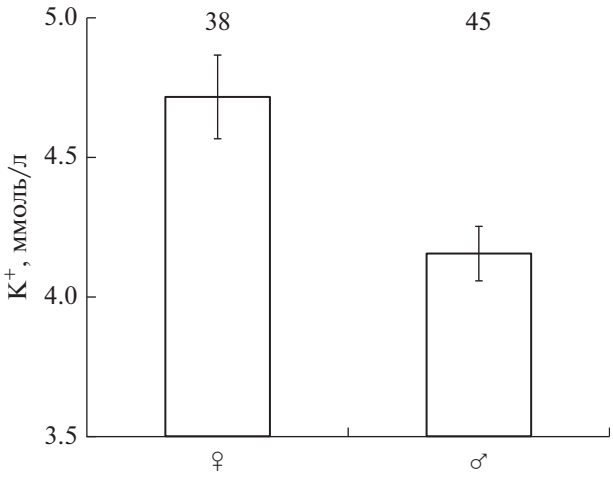


Рис. 5. Концентрация K^+ в крови самок и самцов кумжи *Salmo trutta* из двух близкорасположенных рек (рр. Алатсоя и Улмасенйоки).

вода в рр. Алатсоя и Улмасенйоки различается по этому иону почти в 2 раза. Концентрация Na^+ и Cl^- зависит от возраста особи – уровень этих ионов выше у рыб в возрасте 2+ (по сравнению с годовиками), в дальнейшем (у особей в возрасте ≥2+) остается практически неизменным. При этом по уровню Cl^- достоверно различаются только годовики и рыбы старшего возраста из р. Улмасенйоки. Ранее установлено (Павлов и др., 2017), что в крови пестряток черноморской кумжи за 1–2 мес. до смолтификации из четырех исследованных ионов, в первую очередь, снижается Cl^-. Изменения содержания ионов Cl^- в крови кумжи в возрасте 1+ могут свидетельствовать о подготовке части пестряток в этом возрасте к смолтификации и покатной миграции. В свою очередь, повышение и стабилизация концентраций Cl^- и Na^+ у особей старших возрастных групп (≥2+) в исследованных реках указывают на заметное снижение вероятности смолтификации у кумжи в этом возрасте. Кумжа чаще смолтифицируется в возрасте 2–3 года (L'Abée-Lund *et al.*, 1989; Jonsson, L'Abée-Lund, 1993; Jonsson *et al.*, 2001), в старшем возрасте (≥3+) вероятность ее покатной миграции снижается. По всей видимости, в реках Алатсоя и Улмасенйоки кумжа преимущественно совершает покатную миграцию в возрасте 2-х лет. А к возрасту 2+ в реках остаются преимущественно резидентные особи, имеющие более высокие уровни ионов Cl^- и Na^+ в крови по сравнению с мигрировавшими рыбами. При этом, отсутствие выраженных различий по уровню Cl^- в крови кумжи разного возраста из р. Алатсоя может быть связано с меньшей вероятностью их смолтификации по сравнению с особями из р. Улмасенйоки.

Концентрация K^+ в крови кумжи зависит только от ее пола – у самок она, в среднем, на 13% выше, чем у самцов. Различия у самок и самцов могут быть обусловлены как разной скоростью протекания обменных процессов в организме, так и особенностями их жизненного цикла. Самки кумжи в отличие от самцов имеют бóльшую склонность к миграциям, в то время как самцы, напротив, чаще ведут оседлый образ жизни (Jonsson *et al.*, 2001; García-Vega *et al.*, 2018; Ferguson *et al.*, 2017, 2019; Huusko *et al.*, 2018). Самки в возрасте 1+ из р. Улмасенйоки имеют уровень K^+ в крови на 25% выше, чем самки 1+ из р. Алатсоя, что может отражать разную степень подготовки рыб из этих рек к смолтификации.

Установленные корреляции концентраций исследованных ионов в крови кумжи разного возраста, пола и принадлежности к реке являются отражением осморегуляторного процесса в организме рыб. Он заключается в работе механизмов активного транспорта Na^+, K^+ и Cl^- через цитоплазматическую мембрану против градиента концентрации (Karnaky, 1986; Tipsmark *et al.*, 2002). Для удаления избытка Na^+ и Cl^- из крови Na^+/K^+-АТФ-аза за один цикл своей работы переносит три иона натрия ($3Na^+$) из клетки и два иона калия ($2K^+$) в клетку. В частности, этим процессом обусловлена отрицательная зависимость (–0.46, $p < 0.001$) уровня Na^+ в крови от K^+.

Согласно гипотезе Thorpe et al., для атлантического лосося (Thorpe *et al.*, 1998) вероятность смолтификации и покатной миграции напрямую связаны с половым созреванием. При траектории развития, направленной преимущественно на раннее половое созревание, уже в конце летнего периода может происходить блокировка смолтификации весной следующего года. Мы предполагаем, что такие процессы могут происходить и у кумжи,

которая имеет более разнообразную жизненную историю, чем атлантический лосось. Ранее было показано (Павлов и др., 2020), что формирование траектории развития у кумжи из р. Алатсоя, направленной на раннее созревание происходит в конце первого лета жизни. Обнаруженная в данной работе заметная вариабельность по содержанию ионов в крови кумжи из исследованных рек может дополнительно свидетельствовать о раннем разделении рыб на мигрантов и резидентов. Это означает, что в конце первого лета жизни у кумжи может происходить не только формирование траектории развития, направленной на раннее созревание, но и проходной жизненной стратегии.

Исследованные реки, географически находящиеся рядом, значительно отличаются друг от друга химическим составом воды, что вызывает модификации тех или иных процессов у кумжи, являющейся чрезвычайно пластичным видом (Jonsson, Jonsson, 2011). Известно, что на осморегуляцию рыб оказывают влияние температура (Handeland *et al.*, 2004; Masroor *et al.*, 2018) и pH воды (Gonzalez, Wilson, 2001; Yanagitsuru *et al.*, 2019), которые различаются и в исследованных реках. Степень влияния этих факторов во многом определяется видом рыбы, ее физиологическим состоянием и адаптационными возможностями (Gonzalez, Wilson, 2001; Yanagitsuru *et al.*, 2019). Очевидно, что выявленные различия по концентрациям ионов у кумжи из двух рек помимо гидрохимического режима могут быть обусловлены как другими гидрологическими особенностями водоемов (температурой и расходом воды, их суточными колебаниями), так и физиологическим состоянием кумжи, относящейся к разным популяциям. Оценка этих сложных зависимостей требует дальнейшего исследования.

Таким образом, кумжа из двух исследованных рек различается по содержанию ионов Cl^-, Ca^{2+} в крови рыб. Эти различия связаны с условиями обитания, в частности, с гидрохимией рек. Концентрация Na^+ в крови кумжи отражает возрастные различия рыб, а K^+ – половые. Пестрятки кумжи в возрасте 1+ из двух рек характеризуются различным уровнем Cl^-, Na^+ и K^+, что может отразиться на степени их подготовки к смолтификации весной следующего года.

Авторы выражают благодарность А.О. Касумяну (биологический факультет МГУ) за ценные замечания по тексту рукописи; М.А. Ручьёву (КарНЦ РАН) и Д.А. Ручьеву (ООО “Янисъярви”) за содействие и помощь в проведении исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант 19-14-00015).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Веселов А.Е., Скоробогатов М.А., Ефремов Д.А. Нерестовые популяции пресноводного лосося и кумжи Северного Приладожья // Петрозаводск: Форевер, 2016. 128 с.

Груздева М.А., Кузищин К.В., Павлов Е.Д., Буш А.Г., Белова Н.В., Поляков М.П., Павлов Д.С. Морфофизиологические закономерности формирования жизненных стратегий мальмы *Salvelinus malma* Камчатки // Вопр. ихтиологии. 2017. Т. 57. № 5. С. 587–602.

Макеева А.П. Эмбриология рыб. М.: Изд-во МГУ, 1992. 216 с.

Павлов Д.С., Павлов Е.Д., Ганжа Е.В., Костин В.В. Содержание Na^+, K^+, Cl^- и Ca^{2+} в крови молоди черноморской кумжи *Salmo trutta labrax* при внутрипопуляционной дифференциации // Известия РАН. Серия биологическая. 2017. № 6. С. 585–592.

Павлов Е.Д., Буш А.Г., Костин В.В., Павлов Д.С. Рост и раннее половое созревание кумжи *Salmo trutta* р. Алатсоя (Республика Карелия) // Биол. внутр. вод. 2020. № 6. С. 584–591. https://doi.org/10.31857/S0320965220060145

Павлов Е.Д., Павлов Д.С. Сравнение содержания ионов Na^+, K^+, Ca^+ и Cl^- в крови кумжи *Salmo trutta* из разных рек // Доклады академии наук. 2018. Т. 481. № 3. С. 336–339.

Bohlin T., Dellefors C., Faremo U. Timing of sea-run brown trout (*Salmo trutta*) smolt megration: effects of climatic variation // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1993. V. 50. № 6. P. 1132–1136. https://doi.org/10.1139/f93-128

Evans D.H. Osmotic and ionic regulation by freshwater and marine fishes. In *M.A. Ali* (ed.), Environmental physiology of fishes, Plenum Publ. Corp., New York, 1980. P. 93–122.

Ferguson A., Reed T., McGinnity P., Prodöhl P. Anadromy in brown trout (*Salmo trutta*): A review of the relative roles of genes and environmental factors and the implications for management and conservation. In *G. Harris* (Ed.), Sea trout: Management & science (pp. 1–40). Leicestershire, England: Matador Publishing Ltd. 2017.

Ferguson A., Reed T.E., Cross T.F. et al. Anadromy, potamodromy and residency in brown trout *Salmo trutta*: the role of genes and the environment // J. Fish Biol. 2019. P. 1. https://doi.org/10.1111/jfb.14005

García-Vega A., Sanz-Ronda F.J., Celestino F.L., Makrakis S., Leunda P.M. Potamodromous brown trout movements in the north of the Iberian Peninsula: Modelling past, present and future based on continuous fishway monitoring. Science of the Total Environment. 2018. V. 640–641. P. 1521–1536. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.339

Gonzalez R.J. and Wilson R.W. Patterns of ion regulation in acidophilic fish native to the ion-poor, acidic Rio Negro // J. Fish Biol. 2001. V. 58. P. 1680–1690.

Handeland S.O., Wilkinson E., Sveinsbø B. et al. Temperature influence on the development and loss of seawater tolerance in two fast-growing strains of Atlantic salmon // Aquaculture. 2004. V. 233. P. 513–529.

Huusko A., Vainikka A., Syrjänen J.T., Orell P. Louhi P., Vehanen T. Life-history of the adfluvial brown trout (*Salmo trutta* L.) in eastern Fennoscandia. In *J. Lobón-Cerviá & N. Sanz* (Eds.), Brown trout: Biology, ecology and management (pp. 267–295). Holboken N.J.: Wiley. 2018.

Jones D.A., Bergman E., Greenberg L., Jonsson B. Food availability in spring affects smolting in brown trout (*Salmo trutta*) // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 2015. V. 72. P. 1694–1699.

Jonsson B., Jonsson N. Ecology of Atlantic salmon and brown trout: habitat as a template for life histories // Fish Fish. Ser. 2011. V. 33. 680 p.

Jonsson B., Jonsson N. Early environment influences later performance in fishes // J. Fish Biol. 2014. V. 85. P. 151–188.

Jonsson B., Jonsson N. Egg incubation temperature affects the timing of the Atlantic salmon Salmo salar homing migration // J. Fish Biol. 2018. V. 93. P. 1016–1020. https://doi.org/10.1111/jfb.13817

Jonsson B., Jonsson N., Brodtkorb E., Ingebrigtsen P.-J. Life-history traits of Brown Trout vary with the size of small streams // Functional Ecology. 2001. V. 15. P. 310–317.

Jonsson B., L'Abée-Lund J.H. Latitudinal clines in life history variables of anadromous brown trout in Europe // J. Fish Biol. 1993.V. 43 (Suppl A). P. 1–16.

Karnaky K.J. Structure and function of the chloride cell of Fundulus heteroclitus and other teleosts // Am. Zool. 1986. V. 26. P. 209–224.

L'Abée-Lund J.H., Jonsson B., Jensen A.J. et al. Latitudinal variation in life history characteristics of sea-run migrant brown trout *Salmo trutta* // J. Anim. Ecol. 1989. V. 58. P. 525–542.

Laurent P., Hebibi N. Gill morphology and fish osmoregulation // J. of Zoology. 2011. V. 67(12). P. 3055–3063. https://doi.org/10.1139/z89-429

Lucas M.C., Baras E. Migration of Freshwater Fishes. Blackwell Science, 2001. 420 p.

Masroor W., Farcy E., Gros R., Lorin-Nebel C. Effect of combined stress (salinity and temperature) in European sea bass *Dicentrarchus labrax* osmoregulatory processes // Comp. Biochem. Physiol. Part A. 2018. V. 215. P. 45–54.

McCormick S.D. Endocrine Control of Osmoregulation in Teleost Fish // Am. Zoologist. 2001. V. 41(4). https://doi.org/10.1093/icb/41.4.781

Northcote T.G. Mechanisms of fish migration in rivers // "Mech. Migrat. Fishes. Proc. NATOAdv. Res. Inst., Acquafredda di Maratea, Dec. 13–17 1982". New York; London. 1984. P. 317–355.

Rasmussen G.H. The population dynamics of brown trout (*Salmo trutta* L.) in relation to year-class size // Pols. Arch. Hydrobiol. 1986. V. 33. № 3/4. P. 489–508.

Thorpe J.E. Sea trout: an archetypallife history strategy for *Salmo trutta* L. In: The Sea Trout in Scotland. Eds. M.J. Picker and W.M. Shearer. Proc. Symposium at Dunstaffmage Marine Research Laboratory, 1987. 102 p.

Thorpe J.E., Mangel M., Metcalfe N.B., Huntingford F.A. Modelling the proximate basis of salmonid life-history variation, with application to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. // Evol. Ecology. 1998. V. 12. P. 581–599.

Tipsmark C.K., Madsen S.S., Seidelin M. et al. Dynamics of Na^+, K^+, $2Cl^-$ cotransporter and Na^+, K^+-ATPase expression in the branchial epithelium or brown trout (*Salmo trutta*) and atlantic salmon (*Salmo salar*) // J. Exp. Zool. 2002. V. 293. P. 106–118.

Yanagitsuru Y.R., Hewittb C.R., Le Thi Hong Gam, Pham Phuong-Linh, Rodgerse E.M., Wang T., Bayley M., Do Thi Thanh Huong, Nguyen Thanh Phuong, Brauner C.J. Effect of water pH and calcium on ion balance in five fish species of the Mekong Delta // Comp. Biochem. Physiol. Part A. 2019. V. 232. P. 34–39.

Zydlewski J., Wilkie M.P. Freshwater to seawater transitions in migratory fishes // Euryhaline Fishes. 2012. P. 253–326.

Differences between Ion Level in the Blood of Brown Trout *Salmo trutta* from Two Close Located Rivers before Smoltification

E. D. Pavlov[1, #], E. V. Ganzha[1], and D. S. Pavlov[1]

[1]*Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninsky pr. 33, Moscow, 119071 Russia*

[#]*e-mail: p-a-v@nxt.ru*

The concentrations of Cl^-, Ca^{2+}, Na^+ and K^+ in the blood of the brown trout *Salmo trutta* from two rivers of the Ladoga Lake basin (Alatsoya and Ulmasenjoki) are compared. The levels of Cl^- and Ca^{2+} + in the blood of fish are differs and correlates with the content of chlorides and hydrocarbons in the rivers water. The level of Na^+ (in fish blood from both rivers) and Cl^- (in fish blood from Ulmasenjoki River) are increases till the age of individuals 2+, and then (at the age of ≥3+) does not change nearly. Sexual dimorphism was revealed by the concentration of K^+ in the blood: in females its concentration are 13% higher than in males. The level of K^+ is no ticeably higher in females aged 1+ from Ulmasenjoki River than in females of the same age in Alatsoya River. It is assumed that, along with other factors the changes in the ionic level of brown trout could determine the degree of their preparation for downstream migration for six months before smoltification.

Keywords: brown trout *Salmo trutta*, osmoregulation, blood ions, rivers of Fennoskandia

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 6, с. 602–614

ГЕНЕТИКА

УДК 598.112.23:591.5(574.9)

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ АРЕАЛ *Darevskia rostombekowi* В ЗАКАВКАЗЬЕ

© 2021 г. Ф. А. Осипов*, @, А. А. Вергун, ***, М. С. Аракелян****, Р. К. Петросян****, Н. Н. Дергунова*, Л. А. Неймарк*, В. Г. Петросян***

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

***Институт биологии гена РАН, ул. Вавилова, 34/5, Москва, 119334 Россия*

****Московский педагогический государственный университет, Малая Пироговская ул. 1/1, Москва, 119991 Россия*

*****Биологический факультет Ереванского государственного университета, ул. А. Манкуяна, 1, Ереван, 0025 Армения*

@E-mail: osipov_feodor@mail.ru

Поступила в редакцию 26.08.2019 г.
После доработки 11.11.2019 г.
Принята к публикации 11.11.2019 г.

Представлены результаты анализа генетической изменчивости партеногенетического вида *Darevskia rostombekowi* (Darevsky, 1957) с использованием четырех микросателлит-содержащих локусов. На основе 118 записей с географическими координатами присутствия данного вида в Закавказье были созданы карты потенциального ареала. Анализ генетической структуры популяций показал, что, несмотря на установленную мультиклональность (7 клональных линий в 4 популяциях), *D. rostombekowi* образован в результате единичного акта гибридизации между близкими двуполыми видами. Прогнозируемое распределение *D. rostombekowi* с помощью созданного потенциального ареала выявило новые небольшие местообитания, где присутствие вида ранее не сообщалось. Результаты этого исследования и отсутствие множественных актов гибридизации этих форм могут указывать на регрессию численности. Следовательно, оценка статуса сохранения партеногенетического вида представляется оправданной.

DOI: 10.31857/S1026347021050103

За последние 50 лет получены результаты цитогенетического, молекулярно-генетического анализов однополых и двуполых комплексов видов рода *Darevskia* (Даревский, 1967; Uzzell, Darevsky, 1975; Мартиросян и др., 2002; Малышева и др., 2006; Осипов и др., 2016; Ryskov *et al.*, 2017). Эти результаты указывают на концепцию гибридогенного видообразования у партеногенетических видов скальных ящериц, состоящую в формировании новых однополых гибридных видов, несущих в себе геномы, унаследованные от двух близкородственных родительских видов (Uzzell, Darevsky, 1975; Ryskov *et al.*, 2017). Проведенный комплексный анализ показал, что партеногенетический вид *D. rostombekowi* образован в результате естественной гибридизации между близкими двуполыми видами *D. portschinskii* (отцовский вид) и *D. raddei raddei* (материнский вид) (Uzzell, Darevsky, 1975). Несмотря на определенные успехи исследования *D. rostombekowi* (MacCulloch *et al.*, 1997; Мартиросян и др., 2002; Осипов и др., 2016; Ryskov *et al.*, 2017), вопросы о границах его ареала и видоспецифических параметров абиотических факторов среды, определяющих область распространения изолированных популяций, остаются открытыми. Анализ аллозимных локусов особей различных популяций *D. rostombekowi,* за исключением изолированной популяции Цовак (Tsovak), не выявил изменчивости, что предположительно указывало на моноклональную генетическую структуру (MacCulloch *et al.,* 1997).

Существуют фрагментарные данные по характеру распределения отдельных популяций на территории Армении. Известно, что ящерица *D. rostombekowi* (один из семи партеногенетически размножающихся видов скальных ящериц рода *Darevskia*) занимает сравнительно небольшой по площади ареал, состоящий из нескольких разных по величине изолированных популяций в пределах Северной Армении, прилежащих районах Северо-Западного Азербайджана, и оторванной от основного ареала, маленькой высокогорной реликтовой (~12 тыс. лет) популяции на юго-восточном побережье оз. Севан (MacCulloch *et al.*, 1997; Мар-

Таблица 1. Список исследованных образцов ДНК

Название популяции	Количество особей	Географические координаты
Гош	4	40°42′20.3″ N 45°00′57.7″ E
Цовак	8	40°10′45.0″ N 45°37′22.7″ E
Папанино	21	40°42′27.7″ N 44°45′43.8″ E
Спитак	9	40°48′50.0″ N 44°16′48.7″ E

тиросян и др., 2002; Arakelyan *et al.*, 2011, Petrosyan *et al.*, 2020a). Границы ареала вида в целом, а также отдельных популяций в литературе отсутствуют.

Цель исследования: 1) определить генетическую структуру популяций, обитающих в разных экологических условиях на территории Армении; 2) построить карту пространственного распределения вида *D. rostombekowi* на основе данных находок; 3) выявить биоклиматические, топографические и ландшафтные переменные, определяющие потенциальный ареал вида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Молекулярно-генетический анализ

Для исследования были отобраны образцы ДНК партеногенетического вида *D. rostombekowi* ($n = 42$) из четырех популяций на территории Армении (табл. 1). Ящерицы были отловлены в период с 1997 по 2006 гг. в их естественных местах обитания. Все полевые исследования проводили до момента включения вида *D. rostombekowi* в Красную книгу Армении как вид, “находящийся в опасном состоянии” в соответствии с критериями МСОП (Endangered, EN B1ab) (Agasyan *et al.*, 2010). В работе анализ проводили на основе трех ранее описанных микросателлит-содержащих локусов Du215, Du281, Du323 (Ryskov *et al.*, 2017) и нового Du47G. Данные локусы были установлены для исследования других партеногенетических видов данного рода: *D. unisexualis* (Badaeva *et al.*, 2008), *D. dahli* (Vergun *et al.*, 2014).

Постановку локус-специфической полимеразной цепной реакции проводили с использованием ранее подобранных пар праймеров и условий амплификации (Korchagin *et al.*, 2007; Vergun *et al.*, 2014).

Методика выделения ДНК, анализ микросателлит-содержащих локусов Du215, Du281, Du323, Du47G представлены в работах (Korchagin *et al.*, 2007; Осипов и др., 2016; Ryskov *et al.*, 2017). Полученные в результате секвенирования последовательности были депонированы в GenBank (KM573728–KM573762; HM014002–HM014003; KR559279KR559316; MK622868-MK622872).

Анализ и сопоставление полученных последовательностей проводили в программе MEGA v.7.0.21. Число аллелей, аллельное богатство как мера количества аллелей с поправкой на размер выборки и ожидаемая гетерозиготность как мера разнообразия генов были рассчитаны по каждому локусу и популяции с использованием Fstat v.2.9.3.2. GenePop v.4.2 и online версии POPTREEW. AMOVA-анализ проводили с использованием пакета Poppr (Kamvar *et al.*, 2014). Реализацию множественных выравниваний последовательностей микросателлитных аллелей трех видов производили с помощью алгоритма MUSCLE (Edgar RC. *et al.*, 2004). Эти матрицы были использованы для строительства сети методом ближайшего соседа с помощью MEGA v.7.0.21 (Tamura *et al.*, 2013). Составление генотипов производили путем сравнения и анализа комбинаций аллельных вариантов в популяциях с помощью программы LabConverter V1. (Омельченко и др., 2016).

Создание карты потенциального ареала вида

Сбор полевых данных. Материалом для работы послужили данные, собранные соавторами во время полевых исследований в 1997–2019 гг., и коллекционные материалы кафедры зоологии Ереванского государственного университета (ЕРГУ), Зоологического музея МГУ им. М.В. Ломоносова (ZMMU), музея Зоологического института РАН (ZISP) и Канадского музея Royal Ontario Museum (ROM). Изучены потенциальные местообитания на маршрутах общей протяженностью 3000 км в 2018 г. и 1800 км в 2019 г. Учетные работы проводили в утренние солнечные безветренные часы. Для каждого локалитета географические координаты и высоты были определены с помощью GPS-навигатора Garmin Montana 680t (Garmin Corp., Olathe, KS, США) с погрешностью ±3.5 м. Ящерицы с каждого участка были отловлены и определены в полевых условиях с помощью определителя (Darevsky, 1967; Arakelyan *et al.*, 2011).

Векторные слои мест находок. Для создания векторной базы данных (ВБД) в среде ArcGIS Desktop 10.4.1 использовали полевые, музейные и литературные данные (Даревский, 1967; Uzzell, Darevsky, 1975; MacCulloch *et al.*, 1997; Мартиросян и др., 2002; Arakelyan *et al.*, 2011; Ryskov *et al.*, 2017).

Растровые слои для построения карт ареала. Был проведен обзор литературы для выбора важнейших переменных, определяющих распространение скальных ящериц (Darevsky, 1967; Uzzell, Darevsky, 1975; Kaliontzopoulou *et al.*, 2008; Tarkhnishvili *et al.*, 2010; Arakelyan *et al.*, 2011; Doronin, 2015; Freitas *et al.*, 2016, Petrosyan *et al.*, 2019,

2020b). Выбранные экологические переменные характеризуют климат, топографию и земельный покров/землепользование. Пространственные климатические переменные были взяты из набора данных WorldClim 2.0 (http://worldclim.org/version2) с разрешением 30 s, включающие 21 биоклиматических переменных. В работе анализ проводили для трех различных разрешений (3, 9 и 30 arc second, т.е. ~90, ~270 и ~900 м соответственно) растровых слоев рельефа, климатических параметров и ландшафта. Все эти слои были подготовлены с помощью соответствующего программного модуля Arc GIS Desktop 10.4.1 с использованием кубической функции аппроксимации. В результате этих преобразований все растровые слои были представлены с разрешением ~90, ~270 и ~900 м соответственно.

Для проверки пространственной автокорреляции точек находок из ВБД использовали двухшаговую процедуру, описанную в работах (ESRI, 2017; Aiello-Lammens *et al.*, 2015; Petrosyan *et al.*, 2020b).

Потенциальные модели распределения *D. rostombekowi* были определены с помощью метода максимальной энтропии с использованием MaxEnt 3.4.1 (Phillips *et al.*, 2006) из окружения EcoSpat (De Pous *et al.*, 2011; Di Cola *et al.*, 2017). Для построения модели распределения вида (SDM) использовали 10 запусков MaxEnt со случайным выбором тестовых и обучающих выборок. Во всех вариантах запуска MaxEnt 80% записей находок использовали как обучающие выборки, а 20% записей – как тестовые выборки. Мы использовали индекс Бойса (B_{ind}) для оценки пригодности моделей с помощью пакета EcoSpat (Di Cola *et al.*, 2017). Средний показатель индекса Бойса определяли усреднением индексов 10 моделей для каждого разрешения в отдельности. Важность каждой предикторной переменной определяли, используя таблицу вкладов MaxEnt (Phillips *et al.*, 2006). Важными переменными считались те, которые вносят существенный вклад в модель, т.е. имеют высокие значения перестановочной важности (PI) или высокие значения процента вклада (PC) (Phillips *et al.*, 2006).

Сходство экологических ниш. Сравнительный анализ экологических ниш популяций *D. rostombekowi*, полученных для различных наборов данных проводили с использованием общей концепции, представленной в работах (Petitpierre *et al.*, 2012; Di Cola *et al.*, 2017). Оценку перекрытия ниш, полученных на основе разных наборов точек присутствия, проводили с использованием индекса Schoener's D (Di Cola *et al.*, 2017).

Сравнительный анализ центроидов (средних значений переменных) ниш, определяющих пространственное расположение популяций *D. rostombekowi*, проводили с использованием процедуры общей линейной модели (GLM). В этой модели был использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Если ANOVA показывал существенное различие центроидов, то с помощью методов множественного сравнения Post hoc Тьюки HSD определяли, какие именно центроиды отличались друг от друга.

Статистический анализ и построение диаграмм были выполнены в среде RStudio 1.1.463.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генетическая характеристика популяций. Анализ четырех микросателлит-содержаших локусов Du215, Du281, Du323 и Du47G выявил, что все исследованные особи *D. rostombekowi* являются гетерозиготными по данным локусам. В исследованных популяциях было выявлено от 2 до 5 аллелей в зависимости от локуса. Аллельные варианты каждого локуса представлены в табл. 2.

Структурные различия микросателлитных локусов Du215, Du281 и D323 ранее были описаны (Осипов и др., 2016; Ryskov *et al.*, 2017). Анализ локуса Du47G позволил выявить 5 аллельных вариантов, которые различались структурой микросателлитного кластера, для которого характерны GATA- и GACA-повторы, а так же несовершенные звенья GAT. Кроме того аллельные варианты различались по фиксированным точечным заменам на флангах, по которым их можно разделить на две группы: 1) A (+7), A (+21), G (+52) T (+58), характерная для аллелей Du47G(rost)1 и Du47G(rost)5; 2) T (+7), T (+21), C (+52) T (+58), характерная для аллелей Du47G(rost)2-Du47G(rost)4 (табл. 2).

Количество генотипов было установлено по анализу сочетания аллельных вариантов каждой особи (табл. 3, рис. 1). Анализ аллельных комбинаций по 4 локусам выявил 7 генотипов, неравномерно распространенных в исследуемых популяциях. Особи с одинаковыми генотипами формировали клональные линии. Мажорный клон (генотип 1), был установлен у 24 особей (57% от всех исследованных особей) и представлен в трех популяциях – Гош, Папанино (окрестности г. Дилижан), Спитак. Клон с генотипом 2 встречался у 7 особей (17%). Клон с генотипами 3 (5 особей – 12%) и 4 (3 особи – 7%) были обнаружены только в изолированной севанской популяции Цовак. Остальные генотипы (5, 6 и 7) были представлены только одной особью (2%) и встречались в популяциях Гош, Папанино, Спитак.

Генотипы 1–7 отличаются друг от друга последовательностью микросателлитного кластера. Редкие генотипы, обнаруженные у единичных особей в популяциях, вероятно являются мутационными производными основного (представленного большим числом особей и распространенного в 3 из 4 исследованных популяциях) генотипа. Генотипы 3 и 4 представлены только в

Таблица 2. Структура аллельных вариантов микросателлитных локусов Du215, Du281, Du323 и Du47G партеногенетического вида *D. rostombekowi*

Аллель	Длина (п.о.)	Последовательность микросателлитного кластера	Фиксированные нуклеотидные замены на флангах*	Gene Bank ac. №
Du215 (rost)1	256	5' (GAT)(GATA)$_{10}$(GCAA)$_{11}$ 3'	–	GU972528
Du215 (rost)2	252	5' (GAT)(GATA)$_{9}$(GCAA)$_{11}$ 3'	–	GU972529
Du215 (rost)3	250	5' (GAT)(GATA)$_{9}$ (GCAA)$_{10}$ 3'	TT (–98/99)	GU972530
Du215 (rost)4	248	5' (GAT)(GATA)$_{8}$ (GCAA)$_{11}$ 3'	–	GU972531
Du215 (rost)5	227	5' (GAT)(GATA)$_{4}$(GAT)(GATA)$_{7}$(GCAA)$_{2}$ 3'	–	GU972532
Du281 (rost)1	265	5' (GATA)$_{2}$(GAGAT)(GATA)$_{11}$(GAT)(GATA)$_{12}$(TA)(GATA) 3'	T (–84), A (–19), T (+15), A (+25)	HM114225
Du281 (rost)2	261	5' (GATA)$_{2}$(GAGAT)(GATA)$_{10}$(GAT)(GATA)$_{12}$(TA)(GATA) 3'	T (–84), A (–19), T (+15), A (+25)	HM070256
Du281 (rost)3	253	5' (GATA)$_{2}$(GAGAT)(GATA)$_{11}$(GAT)(GATA)$_{9}$ (TA)(GATA) 3'	T (–84), A (–19), T (+15), A (+25)	HM070257
Du281 (rost)4	191	5' (GATA)$_{10}$ 3'	C (–84), G (–19), C (+15), G (+25)	HM070258
Du323 (rost)1	195	5' (AC)$_{6}$...(GATA)$_{6}$(GAT)(GATA)$_{2}$...(GA)$_{4}$ 3'	C (–23), T (+39)	HM013995
Du323 (rost)2	184	5' (AC)$_{4}$...(GATA) (GGT)(GATA)$_{3}$(GAT)(GATA)...(GA)$_{4}$ 3'	A (–23), C (+39)	HM013996
Du47G (rost)1	180	5' (GATA)$_{8}$(GACA)$_{4}$(GATA)$_{2}$(GAT)(GATA)$_{2}$ 3'	A(+7), A(+21), G(+52)	MK622868
Du47G (rost)2	168	5' (GATA)$_{9}$(GACA)(GATA)(GAT)(GATA)$_{2}$ 3'	T(+7), T(+21), C(+52)	MK622869
Du47G (rost)3	168	5' (GATA)$_{8}$(GACA)(GATA)$_{2}$(GAT)(GATA)$_{2}$ 3'	T(+7), T(+21), C(+52)	MK622870
Du47G (rost)4	164	5' (GATA)$_{8}$(GACA)(GATA)(GAT)(GATA)$_{2}$ 3'	T(+7), T(+21), C(+52)	MK622871
Du47G (rost)5	152	5'(GATA)$_{2}$(GACA)(GATA)$_{4}$(GAT)(GATA)$_{2}$ 3'	A(+7), A(+21), G(+52)	MK622872

Примечание. Даны расстояния в н.п. до (–) и после (+) микросателлитного кластера

Таблица 3. Генотипическое разнообразие в популяциях *D. rostombekowi* по четырем микросателлитным локусам

Генотип	Комбинация аллельных вариантов	Популяции				Количество особей с данным генотипом
		Гош	Цовак	Папанино	Спитак	
1	Du215(2 + 5) + Du281(1 + 4) + Du323(1 + 2) + Du47G(4 + 5)	2	0	14	8	24
2	Du215(2 + 5) + Du281(2 + 4) + Du323(1 + 2) + Du47G(4 + 5)	0	0	6	1	7
3	Du215(4 + 5) + Du281(3 + 4) + Du323(1 + 2) + Du47G(2 + 1)	0	5	0	0	5
4	Du215(4 + 5) + Du281(3 + 4) + Du323(1 + 2) + Du47G(4 + 5)	0	3	0	0	3
5	Du215(2 + 5) + Du281(2 + 4) + Du323(1 + 2) + Du47G(3 + 5)	0	0	1	0	1
6	Du215(3 + 5) + Du281(2 + 4) + Du323(1 + 2) + Du47G(4 + 5)	1	0	0	0	1
7	Du215(1 + 5) + Du281(1 + 4) + Du323(1 + 2) + Du47G(4 + 5)	1	0	0	0	1
Общее количество особей		4	8	21	9	42
Генотипическое разнообразие		3	2	3	2	

изолированной популяции Цовак и являются самыми отдаленными от основного генотипа. Анализ пространственно-частотных распределений наиболее широко распространенных генотипов 1 и 2 и популяционно-специфических генотипов 3 и 4 выявил зависимость между частотами клонов и географическим разделением между тремя северными популяциями и севанской популяцией Цовак.

Принимая генотип 1(G1) за исходный, согласно модели Паркера (Parker *et al.*, 1989), мы можем считать, что остальные обнаруженные генотипы могли быть образованы в результате микросателлитных мутаций уже сформировавшегося основного клона. Это событие отражено на схеме (рис. 2), которая построена на основе сравнительного анализа сочетаний аллельных вариантов по каждому локусу с учетом распространения генотипа и частоты его встречаемости в популяциях. Как видно их схемы, генотипы G2, G7 отличаются от генотипа G1 одной GATA- мутацией в микросателлитном кластере по одному из 4 локусов (G1 отличается от G7 одной мутацией в локусе Du215, G1 от G2 – одной мутацией в локусе Du281). Такая же картина наблюдается между генотипами G2 и G5. Генотип G6 хоть и представлен в популяции Гош, однако имеет сходство с генотипом G2 (представленным в популяциях Спитак и Папанино) за исключением делеции одного GCAA звена в локусе Du215. Несмотря на то, что генотипы G3 и G4 не были обнаружены в других популяциях, кроме Цовак; они связаны с основным генотипом G1 общими аллельными вариантами, однако сильно “удалены” от него множественными изменениями внутри микросателлитного кластера.

В табл. 4 приведены данные расчетов индексов генетического разнообразия в популяциях партеновида по четырем микросателлитным локусам. Уровень ожидаемой гетерозиготности (H_E) варьируется от 0.533 до 0.783 (в среднем, 0.581), а число аллелей (N) от 2 до 4. Показатель степени аллельного богатства (R_s) варьируется от 1.995 до 4.000 (в среднем, 2.685). Самый высокий показатель данного значения установлен в популяции Гош по локусам Du215, Du281 и Du323.

Важнейшие предикторные переменные среды и потенциальный ареал партеногенетического вида. Мы собрали 118 записей с географическими координатами присутствия *D. rostombekowi* на территории Армении и Азербайджана (49 литературных данных и 69 собственных полевых записей). После удаления кластерных точек остались 56 записей, включенных в сокращенный набор для дальнейшего анализа. Эти записи в дальнейшем (полные: $n = 118$, сокращенные $n = 56$) использовали для построения моделей распределения видов и сравнения экологических ниш для трех разрешений ~90, ~270 и ~900 м соответственно.

Мы получили “высокие” значения индекса Бойса ($B_{ind} \pm SD$) и AUC ($\pm SD$) для всех моделей распределения вида. Вклады переменных для различных SDM моделей представлены в табл. 5. Из таблицы следует, что индекс AUC (Phillips *et al.*, 2006) имеет достаточно высокие значения и варьирует от 0.978 (±0.007) до 0.985 (±0.007), которые слабо различаются друг от друга. Последнее означает, что вне зависимости от типа использования данных (сокращенных, полных) и пространственного разрешения слоев, индекс AUC пригодности модели меняется слабо (табл. 5). В отличие от AUC, индекс Бойса чувствителен и позволяет выделять наилучшую модель. В нашем случае наиболее высокая точность модели распределения вида наблюдается только для одного

Таблица 4. Показатели генетического разнообразия в популяциях *D. rostombekowi* по четырем микросателлитным локусам

Локус	Популяция	N	R_s	H_E
Du215	Гош	4	4.000	0.750
	Цовак	2	2.000	0.533
	Папанино	2	1.997	0.512
	Спитак	2	2.000	0.529
	∑	5	2.738	0.581
Du281	Гош	3	3.000	0.679
	Цовак	2	2.000	0.533
	Папанино	3	2.773	0.626
	Спитак	3	2.443	0.582
	∑	4	3.127	0.605
Du323	Гош	2	2.000	0.571
	Цовак	2	2.000	0.533
	Папанино	2	1.997	0.512
	Спитак	2	2.000	0.529
	∑	2	1.995	0.536
Du47G	Гош	2	2.000	0.571
	Цовак	4	3.774	0.783
	Папанино	3	2.186	0.535
	Спитак	2	2.000	0.529
	∑	5	2.883	0.604
Все локусы		16	2.685	0.581

Примечание. N – число аллелей, R_s – уровень аллельного богатства, H_E – значение ожидаемой гетерозиготности.

случая, т.е. когда используются полные данные с пространственным разрешением ~90 м. В этом случае индекс Бойса составляет 0.958 ± 0.004. Наихудшая модель по индексу Бойса 0.813 (±0.02) построена при использовании сокращенных данных с пространственным разрешением ~270 м. Карты распределения вида для этих случаев представлены в рис. 3.

Из табл. 5 следует, что из 8 предикторных переменных только пять (MeanTempDrQ, Sradmean, PrecipCoefVar, IsoTerm, PrecWarmQ) общие для всех 60 моделей (10 репликации × 2 типа набора данных × 3 разрешения). Важность переменной StdDivTemp выделяется почти для всех моделей за исключением моделей, полученных для сокращенных данных для разрешения ~90 м. Важность переменной HighWay, выделяется для всех моделей с разным разрешением при использовании полного набора данных точек находок, а также для моделей с разрешением ~90 м при использовании сокращенных данных. Единственная переменная, которая выделяется только для одного сочетания набора данных (полных) и разрешения (~90 м), является высота над уровнем моря (Elevation).

Визуальный качественный анализ наилучшей (рис. 3а) и наихудшей (рис. 3б) карт показывает, что они, в целом, совпадают в общих чертах по границам ареала, но существует большое различие в деталях. Наилучшая карта (рис. 3а) указывает, что наиболее пригодные местообитания (с вероятностью >0.6) в основном расположены на севере Армении, включая все известные местообитания популяций (Севан, Спитак, Гош, Дилижан, Иджеван-Ноемберян), а также новые небольшие местообитания западной части оз. Севан и в восточной части Нагорного-Карабаха, северной части Армении на границе с Грузией. Наихудшая карта показывает обширные пригодные местообитания на западной части оз. Севана, обширную зону на восточной части Нагорного Карабаха, в северной Армении на границе с Грузией и участки в южной части Грузии.

Таблица 5. Наборы предикторных переменных, определяющих модели распределения *D. rostombekowi* с указанием индексов пригодности AUC и Бойса для карт потенциальных ареалов, полученных с помощью MaxEnt и EcoSpat. Представлены только переменные, которые внесли вклад больше 5% либо по PC или по PI

Переменная*	Полный набор точек находок						Сокращенный набор точек находок					
	Разрешение											
	90 м		270 м		900 м		90 м		270 м		900 м	
	PC	PI	PC	PI	PC	PI	PC	PI	PC	PI	PC	PI
MeanTempDrQ	20.1	31.5	19.6	35.4	20.3	31.6	29	66.8	30	63.7	27.6	60
HighWay	17.6	1.2	12.9	0.5	9.7	1.4	6.2	0.9	4.6	0	4.6	0.1
Sradmean	15.7	17.9	1.2	6.4	4.3	9.4	16.2	5.5	0.7	6.1	3	6.8
PrecipCoefVar	11.2	17.3	19.3	21.7	21.2	23.4	19.6	13.5	21.4	12.1	22.3	16.8
IsoTerm	9.8	3.3	19.3	9	21.7	16.1	8.2	4.8	18.2	3.5	18.6	5.8
PrecWarmQ	7.9	3.5	15.8	6.2	14.3	7.7	9.8	2.6	14.3	3.4	15.2	3.5
StdDivTemp	4.2	18.3	3.7	18.6	1.7	5.0	4.9	4.9	5.2	9.5	4.2	5.8
Elevation	4.7	5.7	1.5	1.6	1	0.8	0.2	1	0.2	1	0.4	0.4
Индекс AUC	0.979 ± 0.011		0.98 ± 0.01		0.978 ± 0.007		0.979 ± 0.009		0.982 ± 0.007		0.985 ± 0.007	
Индекс Бойса	0.958 ± 0.004		0.926 ± 0.006		0.916 ± 0.003		0.814 ± 0.009		0.813 ± 0.02		0.939 ± 0.003	

Примечание. * MeanTempDrQ – средняя температура сухой четверти года (°C), HighWay – расстояние до дорог (м), Sradmean – средняя солнечная радиация (КДж m^{-2} день$^{-1}$), PrecipCoefVar – коэффициент вариации осадков (%), IsoTerm – изотермичность (%), PrecWarmQ – сумма осадков в самой теплой четверти года (mm), StdDivTemp – стандартное отклонение температур (°C), Elevation – высота над уровнем моря (м).

Индексы сходства экологических ниш популяций партеногенетического вида. Результаты анализа перекрывания ниш для разных наборов данных представлены на рис. 4. Показано, что индекс сходства экологических ниш для разных разрешений изменяется в диапазоне от 86 до 90%, в зависимости от разрешения используемых слоев. Доля общих местообитаний, т.е. перекрытие ниш варьируется от 97.8 до 98.8%. Тест сходства экологических ниш, полученных на основе разных наборов данных, не отклоняется для всех разрешений ($P < 0.02$).

Несмотря на высокое сходство экологических ниш при использовании разных наборов данных, тем не менее, центроид по высоте смещается вверх для сокращенных данных (рис. 4г, 4д, 4е). Это означает, что разреживание с целью удаления кластеризованных точек приводит к значительному уменьшению количества точек в местообитаниях северных популяций (Спитак, Гош, Папанино, Иджеван-Ноемберян) и оставляет без изменения количества точек находок в южной части оз. Севан (Цовак). Это в итоге приводит к увеличению центроида высоты и увеличению пригодности обитания на высоте более 2000 м.

Сравнительный анализ центроидов ниш популяций партеногенетического вида. Для проверки статистической значимости различия центроидов ниш по абиотическим факторам среды разных популяций мы проводили их сравнительный анализ. Результаты сравнения средних значений предикторных переменных (центроидов ниш) объединенных северных популяций и изолированной популяции Цовак представлены на рис. 5. Из этого рисунка следует, что экологические условия популяции Цовак статистически значимо различаются от серверных популяций по средней температуре и суммарными осадками сухой четверти года, средней солнечной радиацией, коэффициентом вариации осадков, изотермичностью и высотой над уровнем моря. Южная популяция различается от северных не только по расстоянию до дорог, но и по стандартному отклонению температуры.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сравнительный анализ единичных нуклеотидных мутаций вне микросателлитного кластера (SNV) партеновида *D. rostombekowi* с родительскими видами (*D. r. raddei*, *D. portschinskii*) (Осипов и др., 2016, Ryskov *et al.*, 2017) позволяет утверждать, что партеновид мог образоваться в результате единичного акта гибридизации между близкими бисексуальными особями родительских видов, поскольку исследованные особи партеновида не различались по SNV во всех четырех микросателлитных локусах (рис. 1).

Анализ распределений наиболее широко распространенных генотипов 1 и 2 и популяционно-специфических генотипов 3 и 4 выявил зависимость между частотами клонов и географическим разделе-

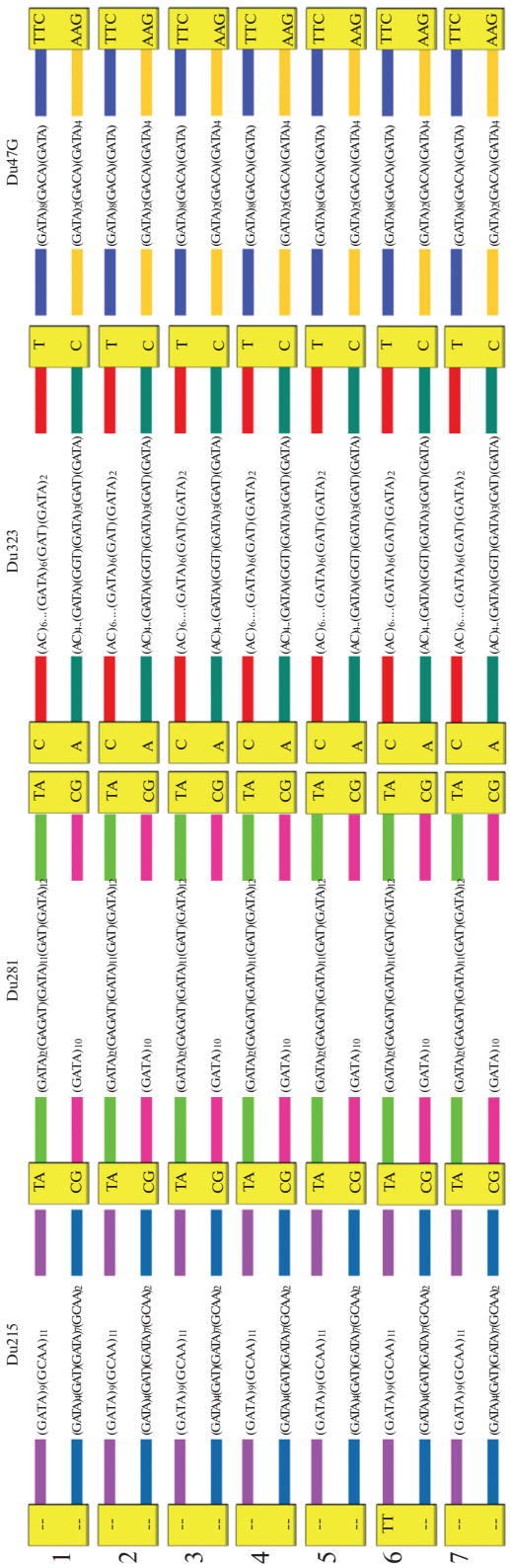


Рис. 1. Схематическое изображение семи генотипов, образованных аллельными комбинациями микросателлитных локусов Du215, Du281, Du323 и Du47G у 42 особей *D. rostombekowi*. Специфичные для родительских видов маркеры SNV показаны в квадратах. Вариабельные микросателлитные кластеры показаны для каждого аллеля.

нием между тремя северными популяциями и севанской популяцией Цовак. Остается нерешенным вопрос, какой из 7 установленных клонов *D. rostombekowi* образовался первым. Предполагая, что у партеновида, образованного в результате одного гибридизационного события, имеется распространенный и чаще всего встречающийся “мажорный” клон с несколькими “минорными” клонами (Parker *et al.*, 1989), то, вероятно, генотип G1 мог быть исходным. Остальные же генотипы являются мутациями G1. Мутации *de novo* во всех четырех исследованных локусах обусловлены делецией или вставкой микросателлитного повтора (рис. 1, табл. 2). Заметные различия генотипов G3 и G4 от основного генотипа G1 и обнаруженных в популяциях Гош, Папанино и Спитак генотипов G2, G5, G6, G7 могут быть связаны со значительными различиями в экологических условиях их местообитаний (рис. 5). Вероятно, другие (переходные клональные линии) между генотипами 1–3 и 4 могли быть утеряны в результате сокращения и/или разрыва ареала *D. rostombekowi*.

В работе показано, что SDM является важным инструментом, который можно использовать для выявления экологических требований популяций *D. rostombekowi* к среде и выбора наиболее важных переменных, определяющих их пространственное распределение. Дополнительный анализ с помощью метода ординации позволяет проводить сравнительный анализ экологических ниш различных популяций и определить меру их пересечения, сходства и выявить значимые сдвиги ниш при определении потенциальных ареалов на основе разных наборов данных точек находок и разрешений слоев предикторных переменных. Эти два подхода, а также генетическая структура популяций, позволяют выявить их особенности и оценить роль экологических факторов в формировании северных и южной популяций данного вида.

Важнейшие переменные, определяющие модель размещения партеногенетического вида. Как показали SDM средняя температура и суммарные осадки в сухой и теплой четверти года, солнечная радиация, коэффициент вариации осадков, изотермичность и высота над уровнем моря являются важными факторами среды, которые оказывают влияние на формирование пространственного распределения ящериц на территории Армении, Нагорного Карабаха и Азербайджана (рис. 3, табл. 5). Из этого следует, что набор переменных, определяющих пригодные местообитания, в значительной степени связаны с термическими условиями и влажностью в сухой и теплый период года соответственно, а также годовыми коэффициентами вариации этих переменных. Причем изотермичность должна быть в пределах 28–34%, а коэффициент влажности осадков 41–52% (рис. 4). Важно отметить, что изотермичность, отражаю-

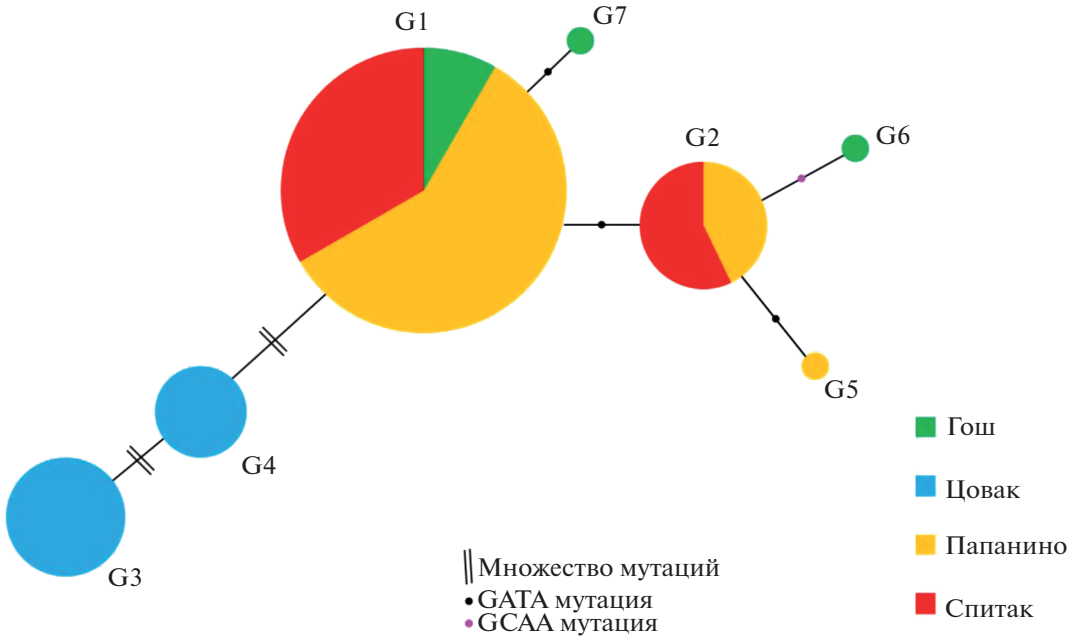


Рис. 2. Схематическое изображение, отражающее взаимоотношения между генотипами 1–7(G1–G7) в исследованных популяциях *D. rostombekowi.* Размер кругов соответствует представленности генотипа в популяции.

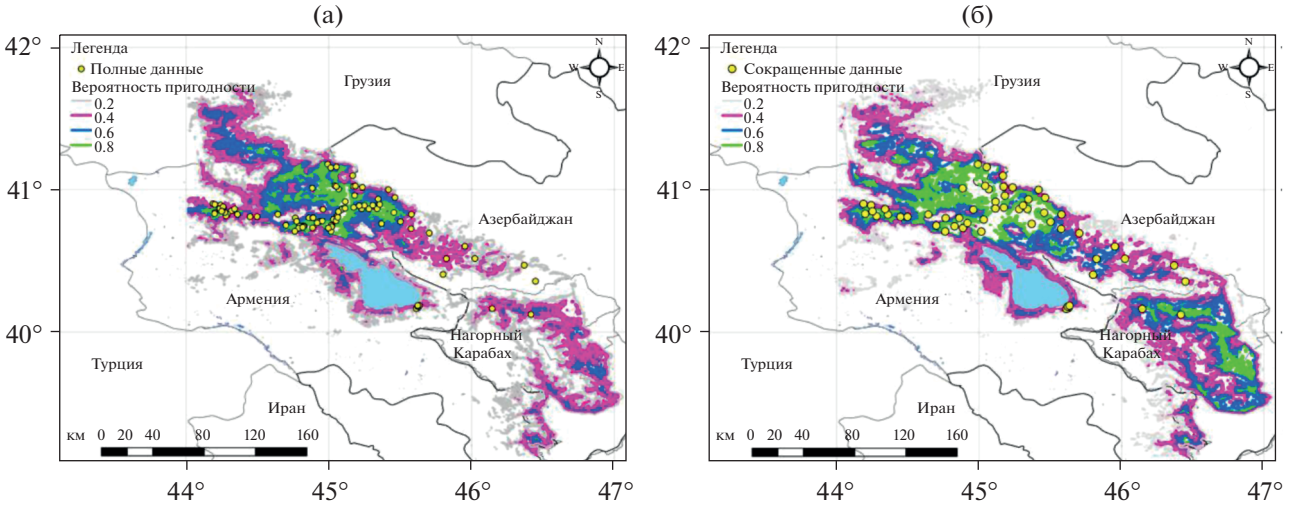


Рис. 3. Карты распределения *D. rostombekowi* с использованием разных наборов данных и разрешений. (а) Полный набор точек находок и пространственное разрешение 90 м, (б) сокращенный набор данных и пространственное разрешение 270 м.

щая достаточно высокую стабильность температуры и низкие ее колебания в местообитаниях, ранее не была отмечена для других видов ящериц, как важнейшая предикторная переменная (Kaliontzopoulou *et al.*, 2008; De Pous *et al.*, 2011). Узкий диапазон изменения этих переменных означает достаточно высокую чувствительность вида к изменению климата. Установленные переменные объясняют экологические особенности, связанные с распределением *D. rostombekowi* и дают представление о факторах, ограничивающих его распространение. Другая важная переменная – солнечная радиация, которая обеспечивает прогреваемость грунта в местообитаниях и меняется в узком диапазоне 4.1–4.2 кВт · ч/м^2. Высота над уровнем моря является важной переменной только для одной – наилучшей модели, которая была получена с использованием слоев с разрешением 90 м (3 s) (табл. 5).

Потенциальный ареал партеногенетического вида. Точки находок и потенциальный ареал *D. ros-*

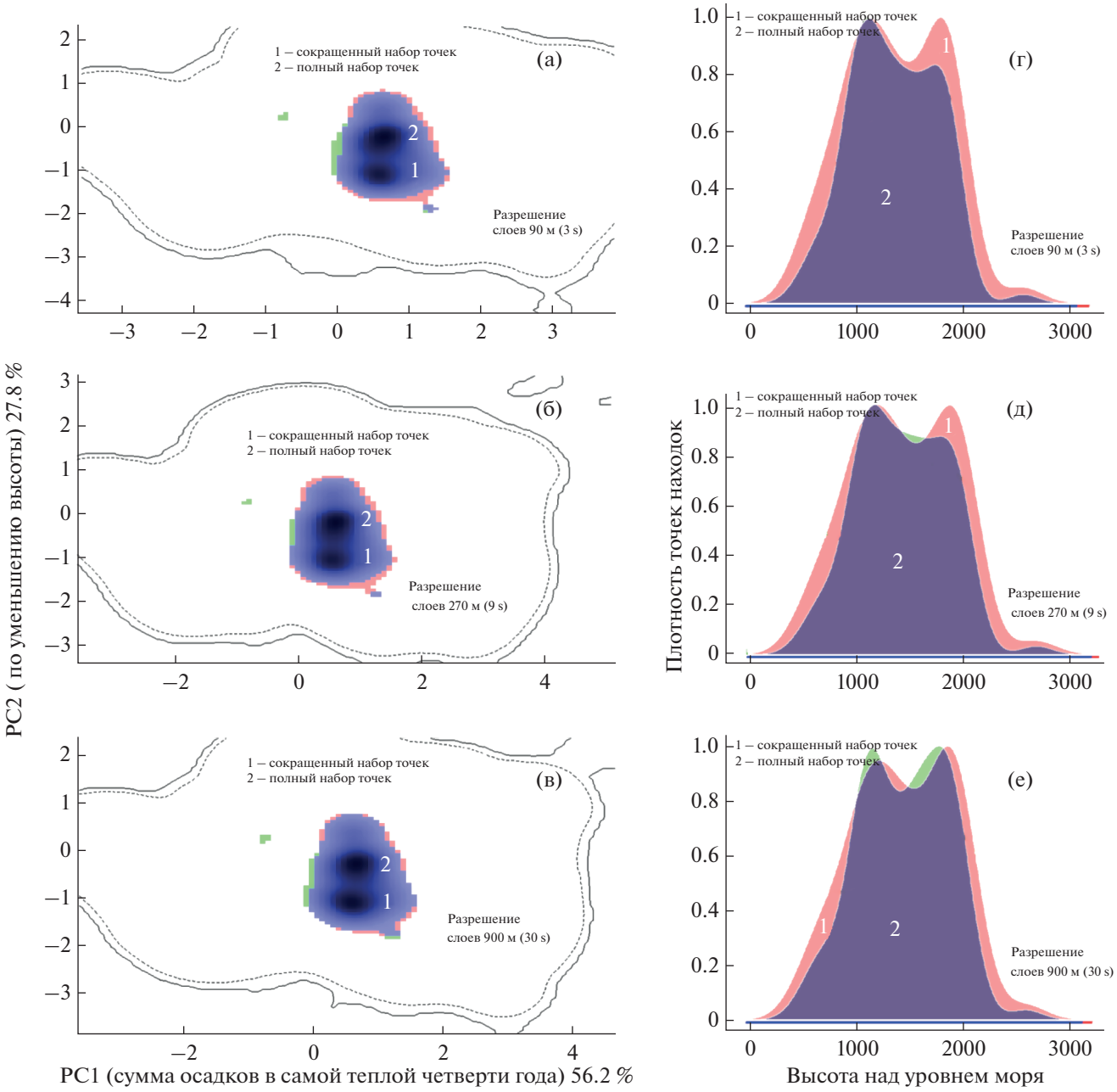


Рис. 4. Экологические ниши *D. rostombekowi* (а), (б), (в), представленные с использованием двух осей главных компонент, и сдвиги центроидов ниш (г), (д), (е) по высоте, полученных на основе сокращенных точек находок относительно полных. Затемненные области показывают реализованные ниши для разных наборов точек и разрешений, пунктирная и сплошная линии на рис. (а), (б), (в) – 90, 100% площади района исследования.

tombekowi показывают, что вид распространен достаточно широко в северно-восточной части Армении, в северо-западной части Азербайджана и на территории Нагорного Карабаха (рис. 3а). Большинство мест, где ранее наблюдался *D. rostombekowi,* хорошо поддаются предсказанию с помощью SDM (Darevsky, 1967; Uzzell, 1975; Мартиросян и др., 2003; Arakelyan *et al.*, 2011). Фактически, модель потенциального ареала *D. rostombekowi* предсказала более широкий диапазон распространения за пределами уже известных подходящих мест обитания популяций Спитак, Гош, Папанино, Иджеван, Ноемберян, Тавуш, а также южной популяции на берегу оз. Севан, где уже был зарегистрирован вид. Кроме этого, модель выделяет новые небольшие потенциальные местообитания западной части оз. Севан и восточной части Нагорного-Карабаха, северной части Армении на границе с Грузией. В

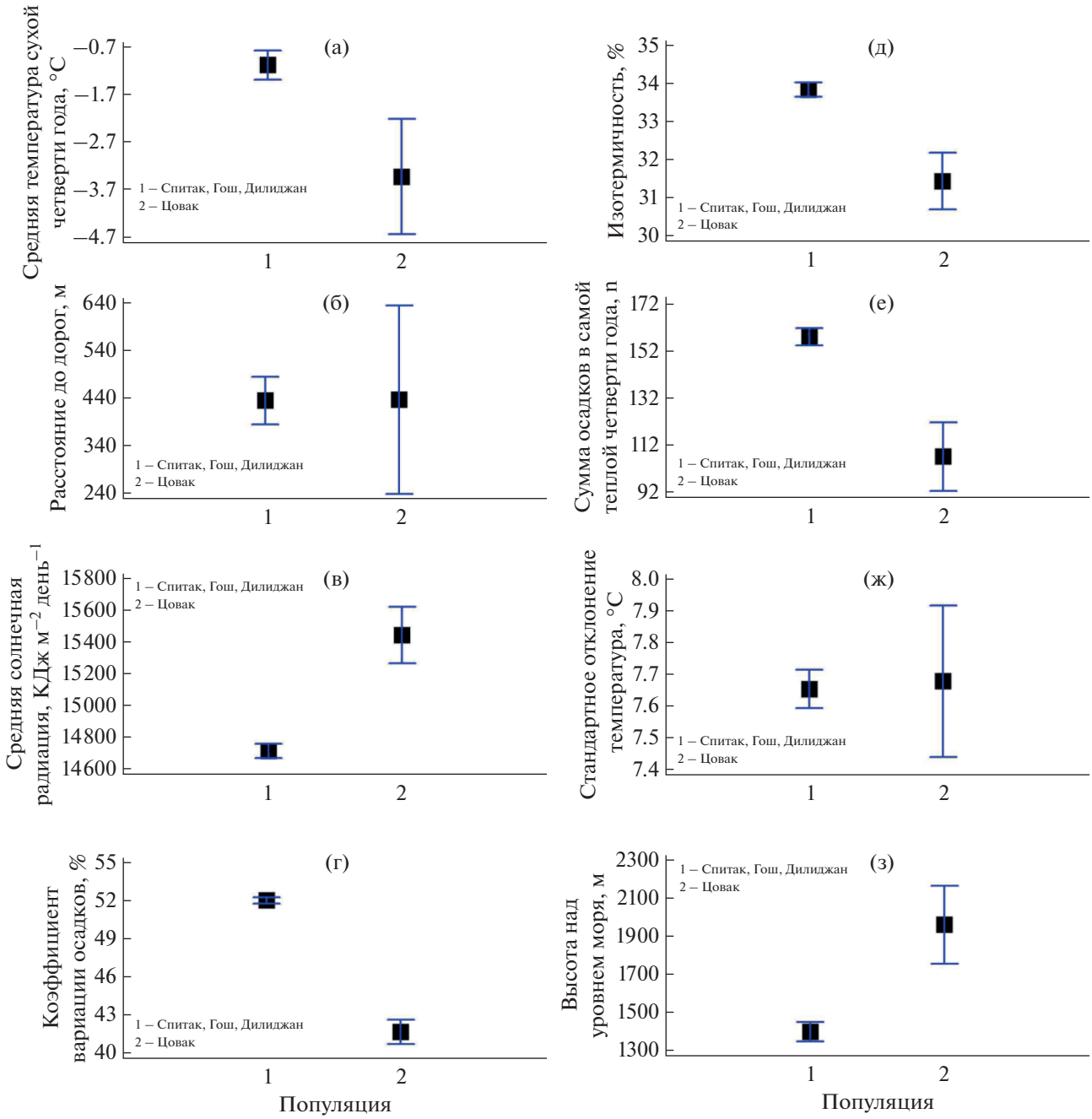


Рис. 5. Сравнение средних значений предикторных переменных (центроидов) серверных популяций и изолированной популяции Цовак. На графике представлены средние значения с 95% доверительными интервалам Тьюки с использованием ANOVA GLM: (а) $F = 6.9$; $P = 0.01$; (б) $F = 0.001$; $P = 0.99$; (в) $F = 30.95$, $P \ll 0.001$; (г) $F = 212.8$, $P \ll 0.001$; (д) $F = 18.98$, $P \ll 0.001$; (е) $F = 22.36$, $P \ll 0.001$; (ж) $F = 0.02$, $P = 0.89$; (з) $F = 13.9$, $P = 0.0003$.

целом, не высокое требование вида к растительности по результатам моделирования MaxEnt, отражено в потенциальной модели распределения, включающей в себя районы, которые расположены в лесной зоне (64%), горных лугах (12%), горных степей (14%) и антропогенно-трансформированных местообитаниях 9% на высотах характерных для горных лесов (1394 ± 37 м) и горных лугов и степей (1957 ± 146 м). Северные популяции в основном расположены в лесной зоне, изолированная популяция Севан – в горных лугах и степях.

Данное исследование систематизировало знания о генетической изменчивости и распределении партеногенетического вида *D. rostombekowi* в нативной части ареала с использованием четырех микросателлит-содержащих локусов Du215, Du281,

Du323, Du47G и 118 записей с географическими координатами присутствия вида на территории Армении, Азербайджана и Нагорного Карабаха, охватывающих большую часть его ареала. В ходе исследования мы дополняли имеющиеся литературные данные собственными полевыми наблюдениями и построили потенциальный ареал вида (ПАВ) на основе анализа климатических, топографических и ландшафтных переменных среды. Результаты генетического структуры (ГС) популяций показали, что, несмотря на наличие семи клональных линий, партеновид характеризуется одной монофилетической формой, т.е. образован в результате единичного акта гибридизации между близкими бисексуальными особями родительских видов. Анализ ПАВ и ГС указал на различие изолированной популяции юго-востока оз. Севан и северных популяций в Армении. Эти различия выражаются как в сдвиге экологических ниш этих популяций относительно друг от друга, так и в различии установленных генотипов. Прогнозируемое в настоящее время распределение *D. rostombekowi* с помощью ПАВ выявило новые небольшие местообитания западной части оз. Севан и восточной части Нагорного Карабаха, северной части Армении на границе с Грузией, где присутствие вида ранее не сообщалось в литературе. Результаты этого исследования и отсутствие полифилетических форм могут указывать на его регрессию. Следовательно, оценка статуса сохранения вида представляется оправданной. Результаты ценны для содействия будущим исследованиям и могут использоваться для ориентации природоохранных организаций, с целью сохранения наиболее важных местообитаний изучаемого вида.

Благодарности. Авторы благодарны международной организации ERSI за предоставление бесплатной лицензии для использования ArcGIS Desktop 10.4.1 по линии Conservation Grant (Esri Sales Order number 3128913; Esri Delivery number – 81833751, Sold-To/End-user customer number – 535452).

Финансирование. Сбор, анализ и подготовка материалов для статьи стали возможными благодаря финансовой поддержке грантов РФФИ (18-34-00361) и (17-00-00427). Молекулярно-генетические исследования выполнены при финансовой поддержке РНФ (19-14-00083).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Даревский И.С. Скальные ящерицы Кавказа: систематика, экология, филогения полиморфных ящериц подрода *Archaeolacerta*. Л.: Наука, 1967. 214 с.

Малышева Д.Н., Даревский И.С., Токарская О.Н., Петросян В.Г., Мартиросян И.А., Рысков А.П. Изучение генетической изменчивости у однополых и двуполых видов ящериц Юго-Восточной Азии рода *Leiolepis* // Генетика. 2006. Т. 42. № 5. С. 581–586.

Мартиросян И.А., Рысков А.П., Петросян В.Г., Аракелян М.С., Асланян А.В., Даниелян Ф.Д., Даревский И.С., Токарская О.Н. Изменчивость мини- и микросателлитных маркеров ДНК в популяциях партеногенетической скальной ящерицы *Darevskia rostombekovi* // Генетика. 2002. Т. 38. № 6. С. 828–835.

Омельченко А.В., Вергун А.А., Омельченко Е.В., Лушникова А.А. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2016610517 Лабораторный конвертер № 1 – LabConverterV1, дата регистрации 13.01.16 (https://patentinform.ru/programs/reg-2016610517.html, проверено 26.08.2019).

Осипов Ф.А., Вергун А.А., Гирнык А.Е., Кутузова Н.М., Рысков А.П. Молекулярно-генетическая характеристика аллельных вариантов микросателлитных локусов Du281, Du215 и Du323 у партеногенетических ящериц *Darevskia rostombekovi* (сем. Lacertidae) // Мол. генетика, микробиология и вирусология. 2016. Т. 34. № 2. С. 58–61.

Agasyan A.L., Kalashyan M.Yu. (eds.). The Red Book of Animals of the Republic of Armenia. Yerevan. Zangak publ. 2010. 368 p.

Aiello-Lammens M.E., Boria R.A., Radosavljevic A., Vilela B., Anderson R.P. SpThin: an R package for spatial thinning of species occurrence records for use in ecological niche models // Ecography. 2015. № 38. P. 541–545.

Arakelyan M.S., Danielyan F.D., Corti C., Sindaco R., Leviton A.E. Herpetofauna of Armenia and Nagorno-Karabakh. SSAR Publications. 2011. Salt Lake City. 154 p.

Badaeva T.N., Malysheva D.N., Korchagin V.I., Ryskov A.P. Genetic variation and de novo mutations in the parthenogenetic Caucasian rock lizard *Darevskia unisexualis* // PLoS ONE. 2008. V. 3. P. 2730. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002730PMID: 18648496

De Pous P., Mora E., Metallinou M., Escoriza D., Comas M., Donaire D., Pleguezuelos J.M., Carranza S. Elusive but widespread? The potential distribution and genetic variation of *Hyalosaurus koellikeri* (Günther. 1873) in the Maghreb // Amphib-Reptil. 2011. № 32. P. 385–397.

Doronin I.V. Distribution data of rock lizards from the Darevskia (praticola) complex (Sauria: Lacertidae) // Curr. Studies Herpet. 2015. V. 15. № 1/2. P. 3–38.

Di Cola V., Broennimann O., Petitpierre B., Breiner F.T., D'Amen M., Randin C., Engler R., Pottier J., Pio D., Dubuis L., Pellissier R.G., Mateo W., Hordijk N., Salamin N., Guisan A. Ecospat: an R package to support spatial analyses and modeling of species niches and distributions // Ecography. 2017. V. 40. P. 1–14.

Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. P. 1792–1797. https://doi.org/10.1093/nar/gkh340PMID:15034147

ESRI (Environmental Systems Research Institute) (2017): Arc GIS Desktop 10.4.1 – ESRI. Redlands. California.

Freitas S., Rocha S., Campos J., Ahmadzadeh F., Corti C., Sillero N., Ilgaz Ç., Kumlutaş Y., Arakelyan M., Harris D.J., Carretero M.A. Parthenogenesis through the Ice Ages: a biogeographic analysis of Caucasian rock lizards (genus *Darevskia*) // Mol. Phylogen. Evol. 2016. V. 102: 117–127.

Kaliontzopoulou A., Brito J., Carretero M.A., Larbes S., Harris D.J. Modelling the partially unknown distribution of wall lizards Podarcis in North Africa: ecological affinities. potential areas of occurrence and methodological constraint // Can. J. Zoology. 2008. V. 86. P. 992–1101.

Kamvar Z.N., Tabima J.F., GruÈnwald N.J. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction // Peer. J. 2014. V. 2. P. 281. https://doi.org/10.7717/peerj.281

Korchagin V.I., Badaeva T.N., Tokarskaya O.N., Martirosyan I.A., Darevsky I.S., Ryskov A.P. Molecular characterization of allelic variants of (GATA)n microsatellite loci in parthenogenetic lizards *Darevskia unisexualis* (Lacertidae) // Gene. 2007. V. 292. P. 126–133.

MacCulloch R.D., Murphy R.W., Kupriyanova L.A., Darevsky I.S. The Caucasian rock lizard *Lacerta rostombekovi*: a monoclonal parthenogenetic vertebrate // Biochem. Syst. Ecol. 1997. V. 25. P. 33–37.

Parker E.D., Walker J.M., Paulissen M.A. Clonal diversity in Cnemidophorus: ecological and morphological consequences. In: Dawley RM, Bogart JP, editors. Evolution and Ecology of Unisexual vertebrates. Albany: New York State Museum Bulletin 466. 1989. P. 72–76.

Petitpierre B., Kueffer C., Broennimann O., Randin C., Daehler C., Guisan A. Climatic niche shifts are rare among terrestrial plant invaders // Science. 2012. V. 335. P. 1344–1348.

Petrosyan V., Osipov F., Bobrov V., Dergunova N., Nazarenko E., Omelchenko A., Danielyan F., Arakelyan M. Analysis of geographical distribution of the parthenogenetic rock lizard *Darevskia armeniaca* and its parental species (*D. mixta, D. valentini*) based on ecological modeling // Salamandra. 2019. V. 55. P. 173–190.

Petrosyan V.G., Osipov F.A., Bobrov V.V., Dergunova N.N., Kropachev I.I., Danielyan F.D., Arakelyan M.S. New records and geographic distribution of the sympatric zones of unisexual and bisexual rock lizards of the genus *Darevskia* in Armenia and adjacent territories // Biodiversity Data J. 2020a. V.8. P. e56030. https://doi.org/10.3897/BDJ.8.e56030

Petrosyan V., Osipov F., Bobrov V., Dergunova N., Omelchenko A., Varshavskiy A., Danielyan F., Arakelyan M. Species Distribution Models and Niche Partitioning among Unisexual Darevskia dahli and Its Parental Bisexual (*D. portschinskii, D. mixta*) Rock Lizards in the Caucasus // Mathematics. 2020b. V. 8(8). https://doi.org/10.3390/math8081329

Phillips S.J., Anderson R.P., Schapire R.E. Maximum entropy modeling of species geographic distributions // Ecol. Model. 2006. V. 190. P. 231–259.

Ryskov A.P., Osipov F.A., Omelchenko A.V., Semyenova S.K., Girnyk A.E., Korchagin V.I., Vergun A.A. Murphy R.W. The origin of multiple clones in the parthenogenetic lizard species *Darevskia rostombekowi* // PLoS ONE. 2017. V. 12(9). e0185161. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185161

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. P. 2725–2729.

Tarkhnishvili D., Gavashelishvili A., Avaliani A., Murtskhvaladze M., Mumladze L. Unisexual rock lizard might be out competing its bisexual progenitors in the Caucasus. // Biol. J. Linn. Soc. 2010. V. 101. P. 447–460.

Uzzell T., Darevsky I.S. Biochemical evidence for the hybrid origin of the parthenogenetic species of *Lacerta saxicola* complex (*Sauria*. Lacertidae) with a discussion of some ecological and evolutionary implications // Copeia. 1975. V. 2. P. 204–222.

Vergun A.A., Martirosyan I.A., Semyenova S.K., Omelchenko A.V., Petrosyan VG., Lazebny O.E. Clonal diversity and clone formation in the parthenogenetic Caucasian rock lizard *Darevskia dahli* // PLoS ONE. 2014. V. 9(3): e91674. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091674PMID: 24618670

Genetic Diversity and Potential Range of *Darevskia rostombekowi* in Transcaucasia

F. A. Osipov[1, #], A. A. Vergun[2, 3], M. S. Arakelyan[4], R. K. Petrosyan[4], N. N. Dergunova[1], L. A. Neymark[1], and V. G. Petrosyan[1]

[1]*Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS, Leninsky pr., 33, Moscow, 119071 Russia*

[2]*Institute of Gene Biology of the RAS, ul. Vavilova, 34/5, Moscow, 119334 Russia*

[3]*Moscow State Pedagogical University, ul. M. Pirogovskaya, 1/1, Moscow, 119991 Russia*

[4]*Department of Biology, Yerevan State University, ul. Alex Manoogian 1, Yerevan, 0025 Armenia*

[#]*e-mail: osipov_feodor@mail.ru*

The results of the analysis of genetic diversity of *Darevskia rostombekowi* (Darevsky, 1957) parthenogenetic species using four microsatellite loci are presented. On the basis of 118 records with the geographical coordinates of the species occurrence in Transcaucasia, maps of the potential range were created. Analysis of the genetic structure of populations showed that, despite the established multiclonality (seven clonal lines in four populations), *D. rostombekowi* was formed as a result of a single act of hybridization between closely related bisexual species. Modelling of *D. rostombekowi* predicted distribution range revealed new small habitats where the presence of the species was not previously reported. The results of this study and the absence of multiple events of hybridization of these forms may indicate a regression in abundance. Consequently, the assessment of the conservation status of the parthenogenetic species seems to be justified.

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 6, с. 615–621

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС *in vitro* КУЛЬТУР *Rhododendron japonicum*

© 2021 г. Н. В. Загоскина*, @, В. М. Катанская*, @@, Т. Н. Николаева*

**Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276 Россия*

@E-mail: zagoskina@ifr.moscow

@@E-mail: vera@katanski.com

Поступила в редакцию 18.05.2021 г.
После доработки 24.05.2021 г.
Принята к публикации 24.05.2021 г.

Исследовано воздействие различных концентрация кадмия (Cd, 42–126 мкМ) на антиоксидантную систему *in vitro* культур рододендрона японского. Показано уменьшение активности супероксиддисмутазы, одного из основных высокомолекулярных антиоксидантов, у гетеротрофных каллусов, выращиваемых на средах с возрастающими концентрациями поллютанта, и увеличение – у фотомиксотрофных. Накопление низкомолекулярных антиоксидантов фенольной природы в этих культурах в большинстве случаев повышалось, особенно у фотомиксотрофного каллуса. Полученные результаты свидетельствуют об изменениях в антиоксидантном статусе каллусных культур рододендрона японского, выращиваемых на средах с Cd, и важной роли как антиоксидантных ферментов, так и низкомолекулярных антиоксидантов в сохранении их жизнеспособности.

Ключевые слова: рододендрон, *Rhododendron japonicum*, каллусная культура, кадмий, антиоксиданты, супероксиддисмутаза, фенольные соединения, флаваны

DOI: 10.31857/S1026347021060196

Одним из приоритетных направлений современной физиологии растений является изучение физиолого-биохимических и молекулярно-генетических механизмов устойчивости дикорастущих и культурных видов к действию тяжелых металлов (Asati *et al.*, 2016; Fryzova *et al.*, 2017). К числу широко распространенных их представителей относится кадмий (Cd). Известно о его высокой подвижности в почвенном растворе, кумулятивности и фитотоксичности (Haider *et al.*, 2021). При действии Cd отмечалось изменение роста и развития растений, ультраструктуры клеточных органелл (митохондрии, хлоропласты), водного и гормонального баланса, увеличение количества активных форм кислорода (АФК) и развитие окислительного стресса (Seregin *et al.*, 2015; Manquián-Cerda *et al.*, 2016; Hayat *et al.*, 2019).

Ослабление окислительной атаки в клетках растений, вызванной действием стрессора, обеспечивается функционированием многокомпонентной системы антиоксидантной защиты, состоящей из высокомолекулярных и низкомолекулярных метаболитов (Pradedova *et al.*, 2011). К их числу относится супероксиддисмутаза (СОД) – высокомолекулярный фермент «первой линии защиты», поддерживающий баланс между генерацией и удалением АФК (Yu *et al.*, 2020). При ее участии осуществляет превращение двух молекул O^{-2} в пероксид водорода и кислород, что способствует снижению (предотвращению) перекисного окисления липидов (ПОЛ) и сохранению стабильности клеточных мембран (Kolahi *et al.*, 2020). К низкомолекулярным антиоксидантам относятся фенольные соединения – одни их наиболее распространенных в растениях вторичных метаболитов (Pradedova *et al.*, 2011; Naikoo *et al.*, 2019). Для них характерно наличие гидроксильных групп в ароматическом кольце, которые легко взаимодействуют со свободными радикалами и ингибируют процессы радикально-цепного окисления (Belščak-Cvitanović *et al.*, 2018). Этот эффект в значительной степени зависит от вида растения, условий его произрастания и содержания фенольных соединений (Llugany *et al.*, 2013; Katanskaya, Zagoskina, 2018; Kolahi *et al.*, 2020).

К числу растений с высоким адаптивным потенциалом и устойчивостью к действию тяжелых металлов, в том числе Cd, относятся представители рода *Rhododendron* L. (Kwon *et al.*, 2020). Для них характерно образование различных фенольных соединений (Qiang *et al.*, 2011). К ним относятся оксибензойные кислоты (протокатеховая, хлорогеновая, галловая) и редко – производные коричной кислоты (кофейная кислота) (Prakash

et al., 2007). У большинства представителей рода *Rhododendron* L. были идентифицированы флавоноиды: гиперозид, авикулярин и кверцетин, и значительно реже – кемпферол и рутин (Prakash *et al.*, 2007; Olennikov, Tankhaeva, 2010). Сообщалось о накоплении в них катехинов – веществ с Р-витаминной капилляроукрепляющей активностью (Bagratishvili, Jikia, 2015). Наличие фенольных соединений в тканях рододендронов позволяет использовать их в фармакологических целях для профилактики и лечения заболеваний различной этиологии (Popescu, Kopp, 2013; Katanskaya, Zagoskina, 2018). Кроме того, они успешно используются для озеленения крупных городов с высоким уровнем промышленных загрязнений, а также в качестве фиторемедиаторов и биоиндикаторов состояния окружающей среды (Katanskaya, Zagoskina, 2018).

Успешным подходом для изучения стрессовых реакций растений являются культуры клеток и тканей, сохраняющие в условиях *in vitro* основные характеристики исходных эксплантов, в том числе способность к образованию фенольных соединений (Nosov, 2012; Nielsen *et al.*, 2019). Однако данные о влиянии тяжелых металлов, в частности Cd, на накопление этих соединений вторичного метаболизма в клеточных культурах рододендронов с различным уровнем внутриклеточной дифференциации отсутствуют.

В связи с этим, целью работы являлось изучение реакции антиоксидантной системы каллусных культур *Rhododendron japonicum* с различным уровнем внутриклеточной дифференциации (гетеротрофные, фотомиксотрофные) на действие Cd.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили каллусные культуры, полученные из стерильных проростков рододендрона японского (*Rh. japonicum* (A. Gray) Suring) и культивируемые на питательной среде Андерсона, содержащей 2-изопентиладенин (5 мг/л), 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (5 мг/л), сахарозу (30 г/л), агар (8 г/л). Каллусы выращивали при температуре 25–26°С, относительной влажности воздуха 70% в темноте или при 16-ти часовом фотопериоде (5000 лк). Продолжительность пассажа составляла 45 сут.

При проведении опытов к основной питательной среде добавляли различные концентрации $Cd(NO_3)_2$ (42, 63, 126 мкМ). Культуры выращивали в течение 33-х сут. Контролем служили каллусы, культивируемые на среде без Cd.

Оценивали морфофизиологические параметры каллусных культур (Zubova *et al.*, 2020).

Содержание воды определяли путем высушивания растительного материала до постоянной массы в термостате при 70°С в течение 72 ч (Zubova *et al.,* 2020).

Фенольные соединения извлекали 96%-ным этанолом из свежего растительного материала при 45°С в течение 45 мин. Полученные экстракты центрифугировали (16000 об./мин, 15 мин) и надосадочную жидкость использовали для спектрофотометрических исследований. Содержание суммы растворимых фенольных соединений определяли с реактивом Фолина-Дениса, флаванов — с 1%-ным ванилиновым реактивом (Zubova *et al.*, 2020). Калибровочные кривые в обоих случаях строили по (–)-эпикатехину.

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), анализируя содержание одного из ее конечных продуктов – малонового диальдегида (МДА). Навеску каллусной ткани гомогенизировали в 5 мл 0.1 М Tris-HCl буфера (pH 7.5), содержащего 0.35 М NaCl, после чего добавляли 1 мл 0.5%-ного раствора ТБК в 20% трихлоруксусной кислоте. Реакционную смесь инкубировали на кипящей водяной бане (30 мин), охлаждали и измеряли оптическую плотность раствора при 532 нм. Для расчета содержания МДА (мкмоль/г сырой массы) использовали коэффициент молярной экстинкции равный 1.56×10^{-5} $см^{-1}$ $М^{-1}$ (Hodges *et al.*, 1999).

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли стандартным методом с использованием нитросинего тетразолия (НСТ) (Никерова и др., 2019). Измеряли уменьшение оптической плотности раствора при 560 нм через 30 мин после инкубации на свету. Активность СОД выражали в единицах активности/г сырой массы.

Эксперименты проводили в 3-кратных биологических и аналитических повторностях. Корреляционный и факторный (ANOVA) анализ осуществляли в программе SigmaPlot 12.3. На диаграммах представлены средние арифметические значения определений (М) и их стандартные отклонения (±SEM).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологические характеристики каллусных культур. Важным аспектом жизнедеятельности *in vitro* культивируемых клеток и тканей является оценка их морфо-физиологических характеристик (Zagoskina *et al.*, 2007*;* Martins *et al.*, 2020). Каллусные культуры *Rh. japonicum*, выращиваемые поверхностным способом на агаризованной питательной среде, имели низкую скорость роста (в среднем, 170–180%). Гетеротрофные каллусы были светло-кремового цвета и средней плотности. Фотомиксотрофные культуры были несколько плотнее, имели зеленовато-желтое окрашивание с небольшими участками сиренево-розового

цвета. Во всех вариантах оводненность каллусов составляла ~82%.

У культур, выращиваемых на средах с различными концентрациями Cd, морфологические характеристики, рост и оводненность были аналогичны таковым контроля. Лишь у фотомиксотрофного каллуса на среде с высокой концентрацией металла (126 мкМ) отмечалось формирование некротизированных участков темно-коричневого цвета, что свидетельствует об изменениях в морфофизиологических характеристиках.

Следовательно, как гетеротрофная, так и фотомиксотрофная каллусные культуры рододендрона японского проявляли достаточно высокую устойчивость к действию Cd, о чем свидетельствовало сохранение их жизнеспособности. Об устойчивости растений рода *Rhododendron* L. к действию Cd отмечено и в литературе (Katanskaya, Zagoskina, 2018).

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ). Для всех растительных клеток изменение уровня ПОЛ, оцениваемое по содержанию малонового диальдегида (МДА), может служить показателем их реакции на действие различных экзогенных факторов (Полесская, 2007). Его увеличение часто считают признаком развития окислительного стресса и изменения физиологического состояния растений (Sin'kevich *et al.*, 2011; de Dios Alché, 2019).

Каллусные культуры рододендрона японского, выращиваемые в контрольных условиях, значительно отличались по содержанию МДА (рис. 1). У гетеротрофной культуры оно было почти в два раза ниже по сравнению с фотомиксотрофной. Это согласуется с данными о том, что при формировании хлоропластов в клетках растений достаточно часто повышается количество АФК (Полесская, 2007; Kreslavski *et al.,* 2012).

При выращивании каллусов рододендрона на средах с поллютантом уровень ПОЛ в них изменялся (рис. 1). В гетеротрофной культуре содержание МДА на средах с 42 и 63 мкМ Cd было статистически равным и на 50% ниже, чем в контроле. При высокой его концентрации (126 мкМ) уровень ПОЛ в каллусе значительно повышался и превышал значение контрольного варианта почти в два раза, что может быть следствием образования значительных количеств АФК и развития окислительного стресса, как отмечалось и другими авторами (Sin'kevich *et al.*, 2011; Fryzova *et al.*, 2017). В фотомиксотрофных культурах во всех исследованных вариантах содержание МДА было ниже, чем в контроле (на 33, 40 и 10% при 42, 63 и 126 мкМ Cd соответственно).

Исходя из полученных данных можно заключить, что снижение уровня ПОЛ в клетках *Rh. japonicum* при действии Cd может свидетельствовать об активации системы антиоксидантной защиты,

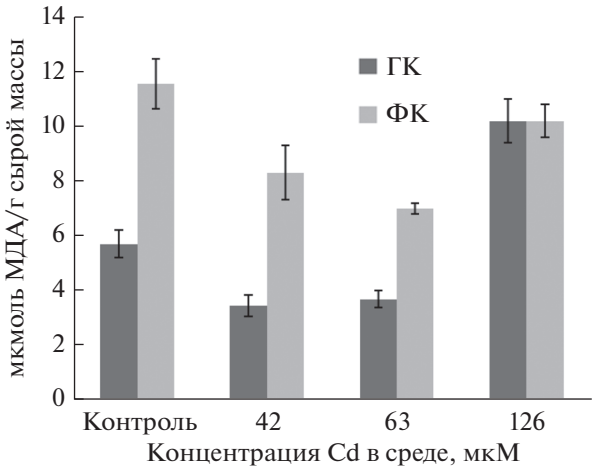


Рис. 1. Содержание малонового диальдегида (МДА) в гетеротрофных (ГК) и фотомиксотрофных (ФК) каллусных культурах *Rhododendron japonicum,* выращенных на основной питательной среде (контроль) или на средах с различными концентрациями Cd. Возраст культур – 30 дней.

включая высокомолекулярные и низкомолекулярных антиоксиданты, эффективно элиминирующие АФК (de Dios Alché, 2019; Haider *et al.*, 2021).

Высокомолекулярные антиоксиданты. К их числу относятся различные ферменты, в том числе СОД – один из важных и эффективных их представителей, участвующих в реакции дисмутации супероксид-анион радикала до H_2O_2 и O_2 (Saibi, Brini, 2018). Эта реакция имеет спонтанный характер и протекает чрезвычайно быстро, тем самым защищая клетки от повреждения продуктами реакций (Никерова и др., 2019).

Определение активности СОД показало почти вдвое более высокий ее уровень в гетеротрофной культуре рододендрона по сравнению с фотомиксотрофной (рис. 2). При выращивании гетеротрофного каллуса на средах с различными концентрациями Cd она возрастала и во всех случаях была выше, чем в контроле. При действии 42 и 63 мкМ металла увеличение активности СОД составило 20%, а при 126 мкМ – 30%. Эти различия в определенной степени согласуются с данными по уровню ПОЛ в этих культурах (рис. 1). Следовательно, более высокая активность СОД в гетеротрофном каллусе рододендрона "обеспечивает" более низкий уровень ПОЛ, что свидетельствует о важной роли этого высокомолекулярного антиоксиданта в поддержании баланса АФК, как это отмечалось и другими авторами (Полесская, 2007; de Dios Alché, 2019).

Иная тенденция отмечена для фотомиксотрофной культуры *Rh. japonicum,* у которой активность СОД на средах с Cd снижалась по сравнению с контролем (на 40% в варианте с 42 мкМ металла и

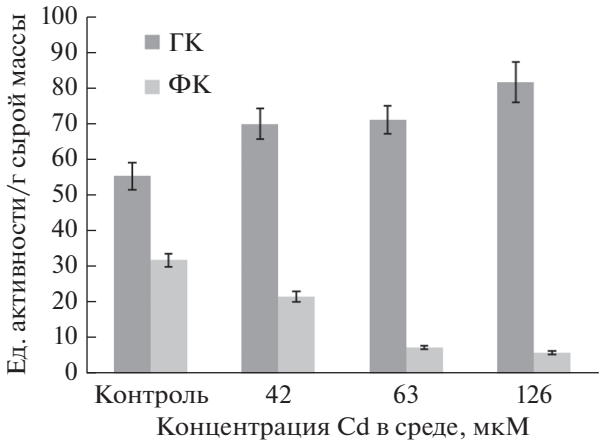


Рис. 2. Активность супероксиддисмутазы в гетеротрофных (ГК) и фотомиксотрофных (ФК) каллусных культурах *Rhododendron japonicum*, выращенных на основной питательной среде (контроль) или на средах с различными концентрациями Cd. Возраст культур – 30 дней.

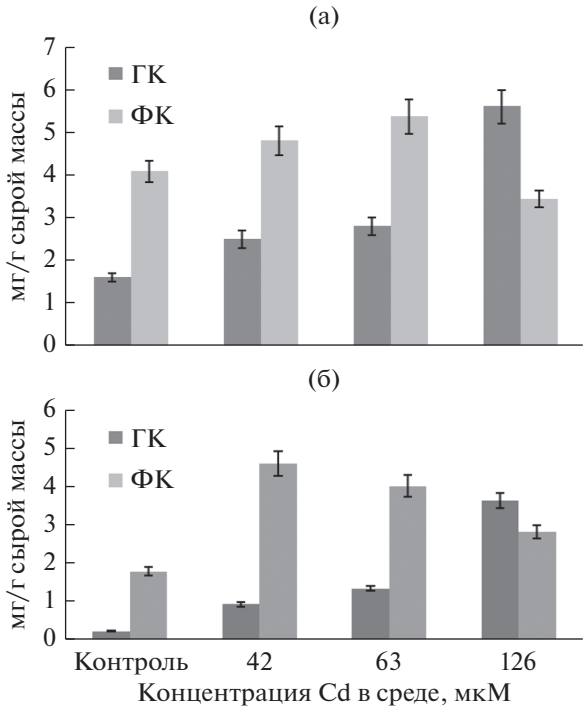


Рис. 3. Содержание суммы растворимых фенольных соединений (а) и флаванов (б) в гетеротрофных (ГК) и фотомиксотрофных (ФК) каллусных культурах *Rhododendron japonicum*, выращенных на основной питательной среде (контроль) или на средах с различными концентрациями Cd. Возраст культур – 30 дней.

на 80% –при 63 и 126 мкМ). Все это свидетельствует о существенных различиях в активности СОД, одного из основных ферментов антиоксидантной защиты, в каллусных тканях *Rh. japonicum* с различным уровнем дифференциации.

Низкомолекулярные антиоксиданты. К их числу относятся фенольные соединения, для которых характерно как взаимодействие с АФК, так и комплексообразование с тяжелыми металлами, в том числе Cd (Llugany *et al.*, 2013; Belščak-Cvitanović *et al.*, 2018).

Каллусные культуры рододендрона значительно отличались по суммарному содержанию фенольных соединений, которое в большинстве исследованных вариантов в 2 и более раз было выше у фотомиксотрофного каллуса (рис. 3а). О том, что *in vitro* культивируемые фотомиксотрофные каллусы, инициированнные из эксплантов различных растений, накапливали больше этих вторичных метаболитов, сообщалось в литературе (Zubova *et al.*, 2020). Это может быть следствием как формирования в них хлоропластов – одного из основных центров биосинтеза фенольных соединений, так и светорегуляции ферментов, ответственных за их образование (Dias *et al.*, 2016; Katanskaya, Zagoskina, 2018).

При культивировании как гетеротрофного, так и фотомиксотрофного каллусов рододендрона на средах с Cd происходило увеличение суммарного содержания в них фенольных соединений (рис. 3а). При этом можно отметить четкую взаимосвязь между концентрацией металла в среде и уровнем накоплением этих вторичных метаболитов: чем она была выше, тем больше накапливалось фенольных соединений. О повышении содержания фенольных соединений при действии этого поллютанта на *in vitro* культивируемые клетки и ткани растений сообщалось в литературе (Zagoskina *et al.*, 2007; Manquián-Cerda *et al.*, 2016). Исключение был вариант с высокой концентрацией Cd (126 мкМ), когда у гетеротрофного каллуса содержание этих веществ в 3.5 раза превышало таковое контроля, тогда как у фотомиксотрофного – всего лишь в 1.5 раза и было даже ниже, чем в варианте с 63 мкМ Cd. Следовательно, значительное количество Cd в питательной среде оказывает негативное действие на биосинтез фенольных соединений в фотомиксотрофной культуре рододендрона.

К компонентам фенольного комплекса растений рода *Rhododendron* L. относятся флаваны – вещества с антиоксидантной активностью, успешно используемые в фармакологии (Popescu, Kopp, 2013). Способность к их образованию характерна и для каллусов рододендрона японского (рис. 3б). У фотомиксотрофной культуры их количество было значительно выше, по сравнению с гетеротрофной. При выращивании этих культур на средах с Cd количество флаванов возрастало: в гетеротрофном каллусе при всех исследованных концен-

трациях поллютанта, а в фотомиксотрофном – в большей степени при 42 мкМ Cd.

Все это свидетельствует о том, что выращивание каллусных культур *Rh. japonicum* с различным уровнем дифференциации на средах с Cd сопровождалось активацией фенольного метаболизма, в том числе и биосинтеза флаванов, количество которых зависло от действующей концентрации поллютанта.

* * *

Высокотоксичный поллютант Cd оказывает стрессовое воздействие на растения: угнетает рост, снижает продуктивность, повышает образование АФК, вследствие нарушения баланса (образование/инактивация). Однако во многих случаях их жизнеспособность сохраняется, что обусловлено различными факторами, включая их видовую принадлежность, устойчивость к действию поллютантов, наличие и регуляцию количества антиоксидантов. В связи с этим представляло интерес изучить ответные реакции клеток на присутствие Cd, используя в качестве модельных объектов каллусы *Rh. japonicum*, сохраняющие в условиях *in vitro* способность к накоплению фенольных соединений (см. рис. 3).

В первую очередь следует подчеркнуть, что выращивание гетеротрофных и фотомиксотрофных культур рододендрона на средах с различными концентрациями Cd не вызывало изменений в их морфофизиологических и ростовых характеристиках, которые сохранялись на уровне контроля (данные не приводятся). Подобная тенденция может быть следствием его “ограниченного” поступлении в клетки и, возможно, частичной сорбцией компонентами питательной среды. Кроме того, рододендроны являются аккумуляторами тяжелых металлов, обладают высокой устойчивостью к действию Cd и аналогичная тенденция характерна для культур рододендрона японского, выращиваемых в условиях *in vitro.*

О жизнеспособности растительных клеток, особенно в условиях действия стрессовых факторов, судят по уровню ПОЛ. В гетеротрофных и фотомиксотрофных культурах *Rh. japonicum* растущих на средах с низким уровнем Cd (42 и 63 мкМ) он был ниже по сравнению с контролем, что свидетельствовало об активации систем защиты Однако при высокой концентрации поллютанта (126 мкМ) уровень ПОЛ в каллусах повышался: в фотомиксотрофной культуре – до уровня контроля, а в гетеротрофной – значительно превышая его, т.е. антиоксидантная система клеток не справлялась с элиминацией АФК, что, вероятно, приводило к развитию окислительного стресса. Следовательно, количество Cd в питательной среде имеет важное значение для каллусных культур рододендрона японского с различным уровнем дифференциации.

Определение активности СОД – одного их ключевых высокомолекулярных антиоксидантов в клетках растений, показало ее более высокий уровень в гетеротрофных каллусах рододендрона японского по сравнению с фотомиксотрофными (рис. 2). На средах с Cd у гетеротрофной культуры она повышалась, тогда как у фотомиксотрофной – снижалась. Это свидетельствует о значительных отличиях в регуляции СОД в культурах рододендрона при действии Cd. Ее функциональная роль в поддержании баланса АФК и предотвращения окислительного стресса более выражена у гетеротрофного каллуса, о чем свидетельствуют данные по увеличению в нем активности СОД (рис. 2) на фоне снижение уровня ПОЛ (рис. 1) в присутствии Cd (42 и 63 мкМ).

Иная тенденция характерна для накопления низкомолекулярных антиоксидантов фенольной природы в каллусных культурах рододендрона японского (рис. 3). Во всех вариантах их количество было выше в фотомиксотрофной культуре, по сравнению с гетеротрофной.

На средах с Cd суммарное содержание фенольных соединений и флаванов в большинстве случаев увеличивалось. Исключением являлись лишь варианты с высокой концентрацией Cd (126 мкМ), когда у фотомиксотрофной культуры оно было ниже по сравнению с таковым у гетеротрофной.

Все это свидетельствует об изменениях в антиоксидантном статусе каллусных культур рододендрона японского, выращиваемых на средах с Cd, и важной роли как антиоксидантных ферментов, так и низкомолекулярных антиоксидантов в сохранении их жизнеспособности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках темы Государственного задания Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (АААА-А-19-11904189005-8).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Никерова К.М., Галибина Н.А., Мощенская Ю.Л., Бородина М.Н., Софронова И.Н. Определение активности супероксиддисмутазы и полифенолоксидазы в древесине *Betula pendula* var. *Carelica* (Betulaceae) при разной степени нарушения ксилогенеза // Растительные ресурсы. 2019. Т. 55(2). С. 213–230.

Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. М.: КДУ, 2007. 140 с.

Asati A., Pichhode M., Nikhil K. Effect of heavy metals on plants: an overview // Int. J. Appl. Innov. Eng. Manage. 2016. V. 5(3). P. 56–66.

Bagratishvili D., Jikia R. Formation of phenolic compounds in callus culture from *Rhododendron caucasicum* Pall. and influence of hormonal effectors on the process // Bull. Georg. Nat. Acad. Sci. 2015. V. 9(2). P. 105–109.

Belščak-Cvitanović A., Durgo K., Huđek A., Bačun-Družina V., Komes D. Overview of polyphenols and their properties // Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications / Ed. Galanakis C.M. Duxford. UK.: Woodhead Publ., 2018. P. 3–44.

Dias M.I., Sousa M.J., Alve R.C., Ferreira I.C. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: a review // Ind. Crops Prod. 2016. V. 82. P. 9–22.

de Dios Alché J. A concise appraisal of lipid oxidation and lipoxidation in higher plants // Redox Biology. 2019. V. 23. 101136. https:// doi. org/ . https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101136

Fryzova R., Pohanka M., Martinkova P., Cihlarova H., Brtnicky M., Hladky J., Kynicky J. Oxidative stress and heavy metals in plants // Rev. Envir. Cont. Toxicol. 2017. V. 245. P. 129–156.

Haider F.U., Liqun C., Coulter J.A., Cheema S.A., Wu J., Zhang R., Wenjun M., Farooq M. Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies // Ecotox. Environ. Safety. 2021. V. 211. 111887. P. 1–22.

Hayat M.T., Nauman M., Nazir N., Ali S., Bangash N. Environmental hazards of cadmium: past, present, and future // Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants / Eds. Hasanuzzaman M., Prasad M.N.V., Fujita M. Academic Press, 2019. P. 163–183.

Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F., Prange R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds // Planta. 1999. V. 207(4). P. 604–611.

Katanskaya V.M., Zagoskina N.V. Plants of genus *Rhododendron* L.: classification, distribution, resistance to stress influences // The Bull. Kharkiv National Agrarian University. Series Biology. 2018. V. 3(45). P. 74–84.

Kolahi M., Kazemi E.M., Yazdi M., Goldson-Barnaby A. Oxidative stress induced by cadmium in lettuce (*Lactuca sativa* Linn.): Oxidative stress indicators and prediction of their genes // Plant Physiol. Biochem. 2020. V. 146. P. 71–89.

Kreslavski V.D., Los D.A., Allakhverdiev S.I. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress // Rus. J. Plant Physiol. 2012. V. 59. P. 141–154.

Kwon S.J., Cha S.J., Lee J.K., Park J.H. Evaluation of accumulated particulate matter on roadside tree leaves and its metal content // J. Applied Biol. Chemistry. 2020. V. 63(2) P. 161–168.

Llugany M., Tolrà R., Martín S.R., Poschenrieder C., Barceló J. Cadmium-induced changes in glutathione and phenolics of *Thlaspi* and *Noccaea* species differing in Cd accumulation // J. Plant Nutr. Soil Sci. 2013. V. 176. P. 851–858.

Manquián-Cerda K., Escudey M., Zúñiga G., Arancibia-Miranda N., Molina M., Cruces E. Effect of cadmium on phenolic compounds, antioxidant enzyme activity and oxidative stress in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plantlets grown *in vitro* // Ecot. Environ. Safety. 2016. V. 133. P. 316–326.

Martins J.P.R., de Vasconcelos L.L., de Souza Braga P.D.C., Rossini F.P., Conde L.T., de Almeida Rodrigues L.C., Gontijo A.B.P.L. Morphophysiological responses, bioaccumulation and tolerance of *Alternanthera tenella* Colla (*Amaranthaceae*) to excess copper under in vitro conditions // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2020. V. 143(2). P. 303–318.

Naikoo M.I., Dar M.I., Raghib F., Jaleel H., Ahmad B., Raina A., Khan F.A., Naushin F. Role and regulation of plants phenolics in abiotic stress tolerance: an overview // Plant Sign. Mol. 2019. P. 157–168.

Nielsen E., Elisabetta M., Temporiti E., Cella R. Improvement of phytochemical production by plant cells and organ culture and by genetic engineering // Plant Cell Reports. 2019. V. 38. P. 1199–1215.

Nosov A.M. Application of cell technologies for production of plant-derived bioactive substances of plant origin // Appl. Biochem. Microbiol. 2012. V. 48. № 7. P. 609–624.

Olennikov D.N., Tankhaeva L.M. Phenolic compounds from *Rhododendron dauricum* from the Baikal region // Chem. Nat. Compounds. 2010. V. 46(3). P. 471–473.

Popescu R., Kopp B. The genus *Rhododendron*: An ethnopharmacological and toxicological review // J. Ethnopharm. 2013. V. 147. P. 42–62.

Pradedova E.V., Isheeva O.D., Salyaev R.K. Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants // Rus. J. Plant Physiol. 2011. V. 58. P. 210–217.

Prakash D., Upadhyay G., Singh B., Dhakarey R., Kumar S., Singh K. Free-radical scavenging activities of Himalayan rhododendrons // Cur. Science. 2007. V. 92. P. 526–531.

Qiang Y., Zhou B.S., Gao K. Chemical constituents of plants from the genus *Rhododendron* // Chem. Biodivers. 2011. V. 8. P. 792–815.

Saibi W., Brini F. Superoxide dismutase (SOD) and abiotic stress tolerance in plants: An overview // Superoxide Dismutase: Structure, Synthesis and Applications / Ed. Magliozzi S. Nova Science Publishers, 2018. P. 101–142.

Seregin I.V., Kozhevnikova A.D., Zhukovskaya N.V., Schat H. Cadmium tolerance and accumulation in excluder *Thlaspi arvense* and various accessions of hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* // Rus. J. Plant Physiol. 2015. V. 62. P. 837–846.

Sin'kevich M.S., Naraikina N.V., Trunova T.I. Processes hindering activation of lipid peroxidation in cold-tolerant plants under hypothermia // Russ. J. Plant Physiol. 2011. V. 58. P. 1020–1026.

Yu X.Z., Yang L., Feng Y.X. Comparative response of SOD in different plants against cadmium and drought stress at the molecular level // Applied Env. Biotech. 2020. V. 5(1). P. 15–28.

Zagoskina N.V., Goncharuk E.A., Alyavina A.K. Effect of cadmium on the phenolic compounds formation in the callus cultures derived from various organs of the tea plant // Rus. J. Plant Physiol. 2007. V. 54. P. 237–243.

Zubova M.Yu., Nechaeva T.L., Kartashov A.V., Zagoskina N.V. Regulation of the phenolic compounds accumulation in the tea-plant callus culture with a separate and combined effect of light and cadmium Ions // Biology Bulletin. 2020. V. 47. P. 593–604.

Influence of Cadmium on Antioxidant Status *in vitro* Cultures of *Rhododendron japonicum*

N. V. Zagoskina[1, #], V. M. Katanskaya[1, ##], and T. N. Nikolaeva[1]

[1]*Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Botanical str. 35, Moscow, 127276 Russia*

[#]*e-mail: zagoskina@ifr.moscow*

[##]*e-mail: vera@katanski.com*

The effect of different concentrations of cadmium (Cd, 42–126 μM) on antioxidant system of *in vitro* cultures of *Rhododendron japonicum* was studied. A decrease in the activity of superoxide dismutase, one of the main high-molecular antioxidants, was shown in heterotrophic calli grown on media with increasing concentrations of the pollutant, and an increase in photomixotrophic ones.The accumulation of low molecular weight phenolic antioxidants in these cultures increased in most cases, especially in photomixotrophic callus.The results obtained indicate changes in the antioxidant status of callus cultures of *Rh. japonicum* grown on media with Cd and the important role of antioxidant enzymes and low molecular weight antioxidants in maintaining their viability.

Keywords: rhododendron, *Rhododendron japonicum*, callus culture, cadmium, antioxidants, superoxide dismutase, phenolic compounds, flavans

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 6, с. 622–628

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 574/577+575.21

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ, ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ *Achillea* × *submicrantha* Tzvelev (Asteraceae) В СРАВНЕНИИ С РОДИТЕЛЬСКИМИ ВИДАМИ

© 2021 г. В. Н. Нестеров*, @, С. А. Сенатор*, С. В. Саксонов*, В. М. Васюков*, Е. С. Богданова*, О. А. Розенцвет*

**Самарский федеральный исследовательский центр РАН, Институт экологии Волжского бассейна РАН, ул. Комзина, 10, Тольятти, 445003 Россия*

@E-mail: nesvik1@mail.ru

Поступила в редакцию 28.05.2020 г.
После доработки 15.06.2020 г.
Принята к публикации 30.06.2020 г.

Исследованы морфологические, экологические и физиолого-биохимические особенности представителей рода *Achillea* (Asteraceae). Объекты исследования – гибрид *Achillea* × *submicrantha* Tzvelev и его родительские виды *A. micrantha* Willd. и *A. setacea* Waldst. et Kit. *A.* × *submicrantha* габитуально схож с *A. micrantha*, отличаясь от него желтовато-белыми цветками и более широкими листьями. Гибридный вид менее подвержен окислительному стрессу, содержит больше зеленых пигментов, мембранных и запасных липидов, что говорит о его большей функциональной активности в сравнении с родительскими видами. С помощью метода искусственных нейронных сетей показано, что по физиолого-биохимическим признакам *A.* × *submicrantha* ближе к *A. setacea*.

Ключевые слова: Achillea, адаптация, гибриды, экологические особенности

DOI: 10.31857/S1026347021060135

Род *Achillea* L. (тысячелистник) из семейства Asteraceae Bercht. et J. Presl (сложноцветные) представлен, в основном, многолетними корневищными травами, реже – полукустарничками. В роде насчитывается от 115 до 200 видов, распространенных, как правило, в субтропических, умеренных и арктических регионах Евразии и Северной Америки (Цвелев, 1994; Ehrendorfer, Guo, 2006; Trock, 2006; Shi *et al.*, 2011). В европейской части России разнообразие рода *Achillea* представлено 17 видами и их гибридами (Цвелев, 1994; Борский, 2018).

Широкое распространение гибридизации у тысячелистников вносит существенный вклад в видообразование (Rieseberg, Wills, 2007), обеспечивая перенос генов между видами и расширяя адаптационные возможности представителей рода *Achillea*, произрастающих в различных экологических условиях (Seehausen, 2004). Цвелев (1994) объясняет происхождение многих таксонов в роде *Achillea* межвидовой гибридизацией. Согласно Ehrendorfer, Guo (2006), гибридизация и дифференциация в роде *Achillea* сформировали сложные видовые комплексы и позволили его представителям заселить самые разнообразные местообитания по всему Северному полушарию (цит. по: Борский, 2018).

У представителей рода *Achillea* часто встречаются гибриды даже между морфологически четко разделенными таксонами с различными уровнями плоидности. Это свидетельствует о том, что вариация кариотипа у тысячелистников не играет большой роли в развитии репродуктивных барьеров (Baltisberger, Widmer, 2016). Известно, что межвидовые и внутривидовые скрещивания приводят к непредсказуемым изменениям генома и, как следствие, метаболома, тем самым влияя на морфологию, адаптацию, рост и развитие новых видов растений (Hammer, 1984). Исследования метаболизма гибридов растений (= нотовидов) может быть инструментом для создания новых форм на основе генетического материала дикорастущих видов при поиске продуцентов биологически активных соединений и гибридов, устойчивых к абиотическим и биотическим воздействиям (Недолужко, 2016; Rai *et al.*, 2017).

Адаптационную способность растений можно оценить по ряду параметров, характеризующих их функциональную активность и уровень стресса. Например, по составу и содержанию липидов оценивается степень проницаемости клеточных мембран, структурные особенности фотосинтетического аппарата, уровень окислительно-восстановительного потенциала (Крепс, 1981; Гонтарь и др., 2006; Розенцвет и др., 2017; Labudda, 2013). Вместе с пигментами такие липиды как моно- (МГДГ) и дигалактозилдиацилглицерины (ДГДГ),

сульфохиновозилдиацилглицерины (СХДГ), входящие в состав хлоропластов, участвуют в фотосинтезе (Nakamura, Li-Beisson, 2016). Предполагают, что каждая молекула таких веществ выполняет специфические биохимические и структурные функции (Хотимченко, 2003; Minoda *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2013; Розенцвет и др., 2019). Фосфолипиды (ФЛ), такие как фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ), как правило, составляют базис бислойных непластидных мембран клетки – плазмалеммы, тонопласта, ЭПР и пр. (Nakamura, 2017). Изменение параметров абсолютного и относительного содержания липидов сказывается на сохранении упорядоченности и структурированности мембран, необходимых для контроля клеточной проницаемости и функциональной активности (Розенцвет и др., 2017). Перекисное окисление липидов (ПОЛ) до сих пор является интегральной характеристикой соотношения процессов анаболизма и катаболизма биополимеров (Тарчевский, 2001). Основным субстратом ПОЛ в клетках являются полиненасыщенные жирные кислоты (ЖК) в составе липидов.

Многие представители рода *Achillea* используются в официальной и народной медицине во всем мире из-за присутствия в них флавоноидов, кумаринов, эфирных масел, обладающих высокой биологической активностью и выраженными целебными свойствами (Saeidnia *et al.*, 2011; Растительные ресурсы..., 2012). При этом химический состав может существенно меняться в зависимости от вида растений и условий произрастания (Юсубов и др., 2000). Выявление степени химической изменчивости полиморфных видов с широким ареалом особенно важно для лекарственных растений, так как от этого зависят возможность заготовки лекарственного сырья и оценка его запасов.

Цель работы – сравнение физиолого-биохимических, морфологических и экологических особенностей гибрида *Achillea* × *submicrantha* Tzvelev и его родительских видов *A. micrantha* Willd. и *A. setacea* Waldst. et Kit.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал собран 26.07.2017 г. на территории национального парка “Бузулукский бор” (Оренбургская область, Бузулукский район, 52°56′ с.ш., 52°02′ в.д.), где была заложена площадка 20 × 20 м, на которой произрастали все три вида. Влажность почвы составила 19%, pH 8.0. Из средней части листьев, собранных с 10–15 растений одного вида, формировали общую биомассу, отбирали три параллельные пробы, замораживали в жидком азоте и хранили до начала анализов.

Оводненность тканей рассчитывали после определения сырой и сухой массы (сыр. и сух. м.) и выражали в % от сыр. м.

Содержание пигментов определяли спектрофотометрически в ацетоновом экстракте (90%) на УФ-спектрофотометре ПЭ-3000 (Россия) при λ 662, 645 и 470 нм. Расчет концентрации хлорофиллов (Хл) *a*, *b* и каротиноидов (Кар) проводили в соответствии с рекомендациями Lichtenthaler (1987).

Интенсивность ПОЛ в листьях растений определяли по накоплению малонового диальдегида и его реакции с тиобарбитуровой кислотой (Uchiyama, Mihara, 1978).

Липиды экстрагировали смесью хлороформа и метанола (1 : 2) с одновременным механическим разрушением тканей (Кейтс, 1975). Разделение липидов осуществляли методом тонкослойной хроматографии. Количество мембранных ФЛ, гликолипидов (ГЛ) и запасных нейтральных липидов (НЛ) определяли денситометрическим методом, используя программу Денскан-04 (Россия). Хроматограммы анализировали в режиме параболической аппроксимации по градуировочным зависимостям, используя ФХ, МГДГ и стерины (СТ) в качестве стандартов.

Метанолиз ЖК осуществляли кипячением в 5%-ном растворе HCl в метаноле. Полученные эфиры анализировали на хроматографе Хроматэк Кристалл 5000.1 (Россия) в изотермическом режиме с использованием капиллярной колонки длиной 105 м и диаметром 0.25 мм RESTEK (США). Температура колонки – 180°C, испарителя и детектора – 260°C, скорость тока газа-носителя (гелий) – 2 мл/мин.

Статистика. Анализ каждого компонента проводили трижды в каждой параллельной пробе. На рисунках результаты представлены в виде средних значений параметра (Mean), их стандартных ошибок (SE), максимальных (Max) и минимальных (Min) значений. Дополнительно проведены стандартный дисперсионный анализ, а также метод моделирования на основе использования нейронных сетей для установления различий/сходства между видами растений. Расчеты выполняли, используя программы Statistica 10 for Windows, Microsoft Excel 2003, Past 3 и Statgraphics Centurion XVI.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфология и экология A. × *submicrantha* в сравнении с родительскими видами. В таб. 1 представлены характерные морфологические признаки исследуемых видов (Цвелев, 1994; Растительные ресурсы...., 2012; Борский, 2018). Можно отметить, что по габитусу *A.* × *submicrantha* ближе к *A. micrantha*.

Согласно Цвелеву (1994) и Борскому (2018), *A. micrantha* и *A. setacea* являются широко распространенными в степной зоне видами. При этом *A. micrantha* предпочитает песчаные почвы и каменистые осыпи, тогда как *A. setacea* населяет более широкий спектр биотопов, встречаясь в злаковых и разнотравных степях, а также по лес-

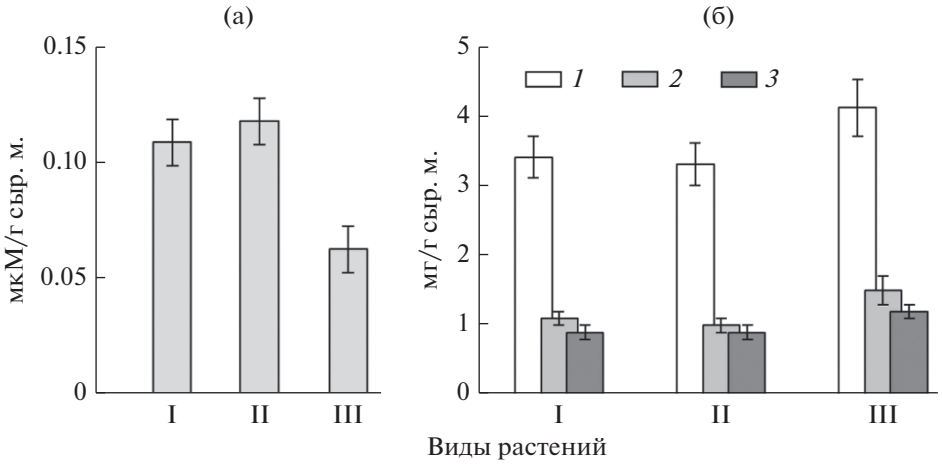


Рис. 1. Содержание малонового диальдегида (МДА) (а) и пигментов (б) в листьях растений *Achillea*. *1* – Хл *a*, *2* – Хл *b*, *3* – Кар. I – *A. setacea*, II – *A. micrantha*, III – *A.* × *submicrantha*. Данные представлены как среднее арифметическое значение ± ошибка средней ($n = 3$, где n – число биологических проб).

ным опушкам. Нотовид встречается в полосе контакта родительских видов, как правило, на песках надпойменных террас и в песчаных степях.

Физиолого-биохимические свойства A. × *submicrantha* в сравнении с родительскими видами. Состояние растений оценивали по оводненности надземной части растений, содержанию мембранных липидов (МЛ), уровню пигментов и окислительных процессов. Вода – главный компонент активных растительных клеток, обычно на ее долю приходится до 90% сыр. м. зеленых растений (Алехина и др., 2005). Оводненность листьев всех трех видов *Achillea* была на одном уровне и составила 65–67% от сыр. м.

Уровень ПОЛ, характеризующий баланс между процессами катаболизма и анаболизма в клетках и тканях листа и отображающий степень стресса, показан на рис. 1а. У *A.* × *submicrantha* содержание МДА – маркера процессов ПОЛ, было в 1.8 раз ниже ($F = 49$, $p = 0.001$), чем у *A. setacea* и *A. micrantha*.

Количество пигментов у *A.* × *submicrantha* оказалось выше в сравнении с родительскими видами. Так количество Хл *a* было на 20% выше ($F = 14$, $p = 0.01$), чем у *A. setacea* и *A. micrantha*, а количество Хл *b* – на 43% ($F = 21$, $p = 0.002$) (рис. 1б). В результате отношение Хл *a*/*b* у *A.* × *submicrantha* было более низким – 2.7, в сравнении с *A. setacea* – 3.1 и *A. micrantha* – 3.3. Кроме того, содержание Кар у нотовида было также выше на 25%.

Процесс фотосинтеза в клетках листьев наряду с пигментами обеспечивается структурой мембран хлоропластов, главными компонентами которых являются ГЛ. По содержанию ГЛ *A.* × *submicrantha* заметно выделялся на фоне родительских видов, в листьях которого ГЛ было, в среднем, на 37% ($F = 11$, $p = 0.01$) больше (рис. 2а). Кроме того, исследованные виды различались по количеству индивидуальных ГЛ (рис. 2б). Причем, в составе ГЛ *A.* × × *submicrantha* обнаружен самый низкий уровень СХДГ (7% против 10.5%) ($F = 34$, $p = 0.001$) и самое высокое значение соотношения МГДГ/ДГДГ – 1.6 ($F = 27$, $p = 0.001$) против 1.3 у *A. setacea* и 1.4 у *A. micrantha*.

В отличие от ГЛ фосфорсодержащие липиды являются главными компонентами бислойных непластидных мембран клетки. Содержание ФЛ в листьях *A.* × *submicrantha* составило в среднем 16.5 мг/г сух. м. и было практически таким же как у *A. setacea*, но на 54% больше ($F = 53$, $p = 0.001$), чем у *A. micrantha* (рис. 2в). Еще большие различия обнаружены в составе индивидуальных ФЛ. Обычно в листьях растений основными ФЛ являются ФХ, ФЭ, фосфатидилглицерин (ФГ), в меньшем количестве присутствуют фосфатидилинозит (ФИ), фосфатидная кислота (ФК), дифосфатидилглицерин (ДФГ). На долю первых трех компонентов в листьях трех видов *Achillea* приходилось 64–74% от суммы ФЛ (рис. 2г). Необходимо отметить необычно высокий вклад ФГ в состав главных компонентов, доля которого у всех видов варьирует от 24 до 40% от суммы ФЛ. Причем у нотовида вклад ФГ был в 1.7 раза ($F = 27$, $p = 0.001$) выше в сравнении с родительскими видами. Однако у родительских видов был выше уровень ФК ($F = 10$, $p = 0.01$). В отношении остальных ФЛ каких-либо отличий не обнаружено.

Некоторые отличия выявлены также в количестве и составе НЛ, которые являются энергетическим и строительным резервом живой клетки. На рис. 2д показано, что общее содержание НЛ в листьях *A.* × *submicrantha* было выше, чем в родительских видах на 23% ($F = 58$, $p = 0.001$). При этом содержание компонентов, влияющих на структуру мембран – стеринов (СТ), у исследованных видов не различалось, также как не отличался уровень

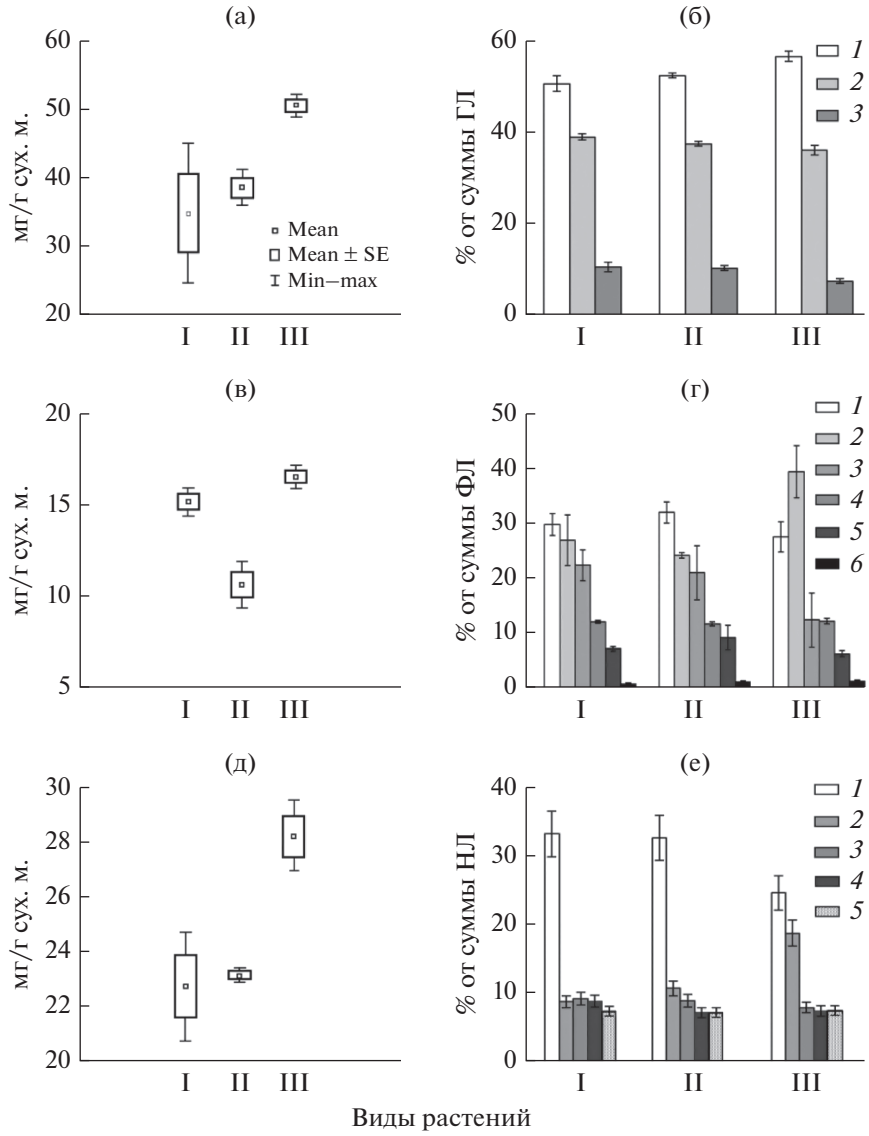


Рис. 2. Общее содержание и состав гликолипидов (а, б), фосфолипидов (в, г) и нейтральных липидов (д, е) в листьях растений *Achillea*; б – гликолипиды: *1* – МГДГ, *2* – ДГДГ, *3* – СХДГ; г – фосфолипиды: *1* – ФХ, *2* – ФГ, *3* – ФК, *4* – ФИ, *5* – ФЭ, *6* – ДФГ; е – нейтральные липиды: *1* – ЭС, *2* – ДАГ, *3* – СЖК, *4* – ТАГ, *5* –СТ. I – *A. setacea*, II – *A. micrantha*, III – *A.* × *submicrantha*. *Mean* – среднее значение, *Mean* ± *SE* среднее значение и их стандартные ошибки, *Max*, *Min* – максимальное и минимальное значение. Данные представлены как среднее арифметическое значение ± ± ошибка средней ($n = 3$, где n – число биологических проб).

триацилглицеринов (ТАГ) и свободных жирных кислот (СЖК). Основные различия связаны с компонентами являющимися предшественниками в синтезе мембранных липидов, а именно диацилглицеринов (ДАГ), а также компонентами, выполняющими запасающие функции, такими как эфиры стеринов (ЭС) (рис. 2е). Отличия состава НЛ гибрида от *A. setacea* и *A. micrantha* заключались в более низком (на 8%) ($F = 18$, $p = 0.004$) содержании ЭС в клетках листьев и в более высоком содержании ДАГ (на 9%) ($F = 47$, $p = 0.002$). Следует отметить, что во всех видах *Achillea* основную запасающую функцию среди НЛ, по-видимому, выполняют ЭС, но не ТАГ.

Основными ЖК в листьях исследованных растений были С18:3, С18:2, С18:1, С16:0, С18:0. Их доля составила 89–92% от суммы всех ЖК (табл. 2). Относительное содержание главной ненасыщенной кислоты С18:3 у всех трех видов растений было на уровне 43–50% от суммы ЖК, главной насыщенной кислоты С16:0 – на уровне 18–20%. То есть, состав ЖК *A.* × *submicrantha* практически не отличался от состава ЖК *A. setacea* и *A. micrantha*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенный анализ морфологических признаков выявил как черты сходства, так и различий

Таблица 1. Морфологические признаки трех таксонов *Achillea*

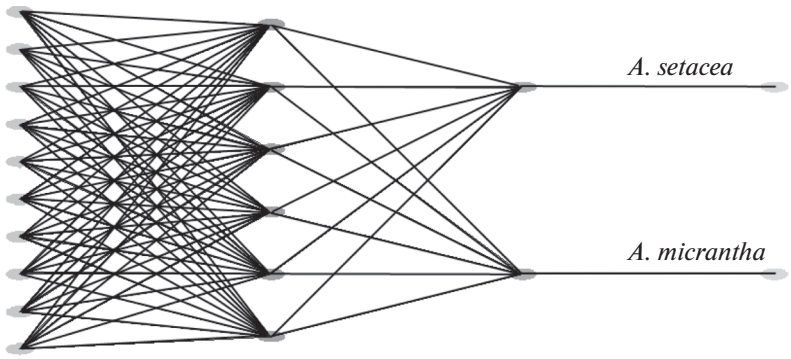
Габитус/орган	Вид растений		
	A. setacea	*A. micrantha*	*A.* × *submicrantha*
Внешний вид	Растение густо опушено длинными спутанными волосками, 10–60 см выс.	Растение, покрытое тонким сероватым войлочком, 20–50 см выс. Стебли простые, обычно с укороченными побегами в пазухах стеблевых листьев, реже – в верхней части слабо разветвленные	Сероватое от обильного, более или менее прижатого опушения многолетнее травянистое растение 15–50 см выс. с розеточными вегетативными побегами и прямостоячими облиственными цветущими стеблями
Корневая система	Корневища горизонтальные, длинные, дающие одиночные надземные побеги	Имеется каудекс либо короткое вертикальное корневище, иногда – тонкие горизонтальные ползучие корневища желтоватого цвета, дающие тесно расположенные надземные побеги	Корневище тонкое, с недлинными подземными побегами. Способен к активному вегетативному размножению – часто формирует клоны
Листья	Стержень листа 0.5–0.8 мм дл. Нижние листья в очертании узколанцетные, до 25 см дл., 2 см шир. Стеблевые листья триждыперистые. Листовых сегментов второго порядка 7 или 9 шт.	Стеблевые листья, как правило, перистые или дважды-перистые. Концевой шипик листа хорошо выражен, начинается внезапно. Промежуточных сегментов листа обычно нет	Листья очередные, 3–5(10) см дл. с рассеченными пластинками, в очертании линейные или ланцетные, без промежуточных долек или зубцов; доли первого порядка у основания до 1.5 мм шир.
Соцветия	Корзинки в плотных, сильно выпуклых, часто полушаровидных щитках, цилиндрические; обертки корзинок 2.8–3.3 мм дл. и 1.5–2.2 мм шир., листочки обертки без каймы по краю. Ложноязычковые цветки белые, 1–1.5 мм дл.	Корзинки в густых, слабо выпуклых щитках. Обертки 2–3 мм шир.; листочки обертки, как правило, с белой каймой по краям, килеватые. Ложноязычковые цветки, как правило, желтые	Общие соцветия – относительно густые сложные щитки. Обертки 2–3.3 мм дл. и 1.7–2.6 мм шир.; листочки обертки явно отделены от прицветников; цветоложе выпуклое. Ложноязычковые цветки светло-желтые или желтовато-белые

Таблица 2. Состав основных жирных кислот в листьях растений *Achillea*

Жирные кислоты	*A. setacea*	*A. micrantha*	*A.* × *submicrantha*
C16:0	20.1 ± 2.1	18.8 ± 0.8	17.8 ± 1.8
C18:0	1.2 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.1 ± 0.3
C18:1	3.9 ± 1.9	2.9 ± 0.5	3.5 ± 1.5
C18:2	22.8 ± 1.8	19.3 ± 1.3	19.7 ± 2.7
C18:3	42.6 ± 2.3	46.7 ± 2.6	50.4 ± 4.0
Другие	9.4 ± 0.4	10.9 ± 1.0	7.5 ± 1.2

у *A.* × *submicrantha* в сравнении с родительскими видами. *A.* × *submicrantha* габитуально схож с *A. micrantha*, отличаясь от него желтовато-белыми цветками и более широкими листьями.

В то же время анализ особенностей физиолого-биохимического состава позволил выявить, что *A.* × *submicrantha* менее подвержен окислительному стрессу, при этом в его листьях содержится больше зеленых пигментов, мембранных и запасных липидов, что говорит о его большей функциональной активности. Следует отметить, что в составе липидов наиболее быстро и выражен-



Слои → входной	Промежуточный	Суммирующий	Выходной
10 переменных	6 случаев	2 нейрона	2 группы

Рис. 3. Архитектура построенной сети. Слева – 10 биохимических характеристик (уровень ПОЛ, содержание пигментов, содержание общих и индивидуальных ГЛ, ФЛ, НЛ) по которым обучалась сеть. Справа – результат классификации: *A. setacea* и *A. micrantha*.

но отображаются все изменения, происходящие в организме, инициируемые как внутренними, так и внешними факторами (Акмурзина, 2012).

Для выявления степени родства *A.* × *submicrantha* по отношению к родительским видам по всем исследованным физиолого-биохимическим параметрам и их комбинациям была обучена нейронная сеть (на основе характеристик родительских видов *A. setacea* и *A. micrantha*), которая в 83% случаев правильно определяла виды *A. setacea* и *A. micrantha* (рис. 3).

Проведенный анализ нотовида в сравнении с родительскими видами с использованием нейронной сети показал, что в отличие от внешнего сходства с *A. micrantha* по физиолого-биохимическим признакам нотовид ближе расположен к *A. setacea*. Это может быть связано с элиминацией хромосом одного из родителей, что приводит к изменениям функциональных параметров и влияет на морфологию, адаптацию, рост и развитие нового вида растений (Hammer, 1984; Родионов и др., 2019). Появление *A.* × *submicrantha* в природе привело к тому, что он занял не промежуточное положение между *A. setacea* и *A. micrantha* по липидному и пигментному профилю листьев, а получил “новые” биохимические особенности, которые, вероятно, и позволили ему занять часть ареала родительских видов. Большее содержание зеленых пигментов может положительно отразиться на способности растения к улавливанию света и увеличению фотосинтетической активности. Это в свою очередь влияет на синтез биополимеров, с чем может быть связано более высокое содержание мембранных ГЛ, ФЛ и запасных НЛ. Возможно, в случае с *Achillea* конкурентное преимущество в плане роста и распространения получит именно *A.* × *submicrantha*, а не *A. setacea* и *A. micrantha*.

Представленный в работе подход к исследованию гибридов растений, основанный на выявлении их физиолого-биохимических особенностей и применении моделирования на основе нейронных сетей с привлечением родительских видов, может использоваться для анализа процессов видообразования и прогноза распространения новых видов растений, а также для отбора видов с заданными свойствами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Акмурзина В.А., Селищева А.А., Швец В.И. От анализа липидов к липидомике // Вестник МИТХТ. 2012. № 6. С. 3–21.

Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В., Мейчик Н.Р., Носов А.М., Полесская О.Г., Харитонашвилли Е.В., Чуб В.В. // Физиология растений. М.: Изд. Центр Академия, 2005. 640 с.

Борский М.Н. Изменчивость и таксономия видов рода *Achillea* L. (подрода *Achillea*) Европейской России: дисс. ... канд. биол. наук. М.: МСХА им. К.А. Тимирязева, 2018. 222 с.

Гонтарь О.Б., Жиров В.К., Хаитбаев А.Х., Говорова А.Ф. Возрастные аспекты адаптации растений в экстремальных условиях // Вестник МГТУ. 2006. № 5. С. 729–734.

Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975. 322 с.

Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. Л.: Наука, 1981. 339 с.

Недолужко А.И. Межвидовые гибриды некоторых восточно-азиатских представителей рода *Chrysanthemum* L. и анализ их устойчивости // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2016. № 5. С. 658–665.

Растительные ресурсы России: дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 5. Семейство Asteraceae (Compositae). Ч. 1. Роды *Achillea – Doronicum*. СПб.; М.: Товарищество науч. изд. КМК, 2012. 316 с.

Родионов А.В., Амосова А.В., Беляков Е.А., Журбенко П.М., Михайлова Ю.В., Пунина Е.О., Шнеер В.С., Лоскутов И.Г., Муравенко О.В. Генетические последствия межвидовой гибридизации, ее роль в видообразовании и фенотипическом разнообразии растений // Генетика. 2019. № 3. С. 255–272.

Розенцвет О.А., Нестеров В.Н., Богданова Е.С. Структурные и физиолого-биохимические аспекты солеустойчивости галофитов // Физиология растений. 2017. № 4. С. 251–265.

Розенцвет О.А., Кособрюхов А.А., Богданова Е.С., Нестеров В.Н. Дневная динамика структурно-функциональных параметров фотосинтетического аппарата галофитов дикой флоры // Физиология растений. 2019. № 6. С. 1–10.

Тарчевский И.А. Метаболизм растений при стрессе. Казань: Фэн, 2001. 448 с.

Хотимченко С.В. Липиды морских водорослей-макрофитов и трав. Структура. Распределение. Анализ. Владивосток: Дальнаука, 2003. 233 с.

Цвелев Н.Н. Флора европейской части СССР. Т. 7. СПб.: Наука, 1994. С. 114–127.

Юсубов М.С., Калинкина Г.И., Дрыгунова Л.А., Покровский Л.М., Королюк Е.А., Ткачев А.В. Химический состав эфирного масла тысячелистников обыкновенного (*Achillea millefolium* L.) и азиатского (*Achillea asiatica* Serg.) // Химия растительного сырья. 2000. № 3. С. 25–32.

Baltisberger M., Widmer A. Chromosome numbers and karyotypes within the genus *Achillea* (Asteraceae: Anthemideae) // Willdenowia. 2016. V. 46. P. 121–135.

Ehrendorfer F., Guo Y.-P. Multidisciplinary studies *Achillea* L. sensu lato (Compositae – Anthemideae): new data on systematics and phylogeography // Willdenowia. 2006. V. 36. P. 69–87.

Hammer K. Das domestikationssyndrom // Kulturpflanze. 1984. V. 32. P. 11–34.

Labudda M. Lipid peroxidation as a biochemical marker for oxidative stress during drought. An effective tool for plant breeding. E-wydawnictwo, Poland. 2013. http://org./doi:wydawnictwo.eu/document/documentpreview/3342. P. 1–12.

Lichtenthaler H.K. Chlorophyll and carotinoids: pigments of photosyntethetic biomembranes // Meth. Enzimol. 1987. V. 48. P. 331–382.

Minoda A., Sonoike K., Okada K., Sato N., Tsuzuki M. Decrease in the efficiency of the electron donation to tyrosine Z of photosystem II in an SQDG-deficient mutant of *Chlamydomonas* // FEBS Lett. 2003. V. 553. P. 109–112.

Nakamura Y., Li-Beisson Y. Lipids in plant and algae development. Springer International Publishing: Switzerland, 2016. 533 p.

Nakamura Y. Plant phospholipid diversity: emerging functions in metabolism and protein-lipid // Trend Plants Sci. 2017. V. 22. P. 1027–1040.

Rai A., Saito K., Yamazaki M. Integrated omics analysis of specialized metabolism in medicinal plants // Plant J. 2017. V. 90. P. 764–787.

Rieseberg L.H., Wills J.H. Plant speciation // Science. 2007. V. 317. P. 910–913.

Saeidnia S., Gohari A.R., Mokhber-Dezfuli N., Kiuchi F. A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea* // DARU J. Pharm. Sci. 2011. V. 19. P. 173–186.

Seehausen O. Hybridization and adaptive radiation // Trends Ecol. Evol. 2004. V. 19. P. 198–207.

Shi Z., Humphries C.J., Gilbert M.G. Achillea // Flora of China Vols. 20–21 (Asteraceae) / Eds Wu Z.Y., Raven P.H. Beijing: Science Press, Missouri Botanical Garden Press, 2011. P. 759–762.

Trock D.K. Achillea / Flora of North America North of Mexico. New York, Oxford University Press. 2006. P. 492–494.

Wu W., Ping W., Wu H., Li M., Gu D., Xu Y. Monogalactosyldiacylglycerol deficiency in tobacco inhibits the cytochrome b_6f-mediated intersystem electron transport process and affects the photostability of the photosystem II apparatus // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1827. P. 709–722.

Uchiyama M., Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test // Anal. Biochem. 1978. V. 86. P. 287–297.

Morphological, Ecological, Physiological and Biochemical Features of *Achillea* × *submicrantha* Tzvelev (Asteraceae) Compared to Parental Species

V. N. Nesterov[1, #], S. A. Senator[1], S. V. Saxonov[1], V. M. Vasyukov[1], E. S. Bogdanova[1], and O. A. Rozentsvet[1]

[1]*Samara Federal Research Scientific Center RAS, Institute of Ecology of the Volga Basin RAS, Komzina st. 10, Tolyatti, 445003 Russia*

[#]*e-mail: nesvik1@mail.ru*

The morphological, ecological, and physiological biochemical characteristics of plants of the genus *Achillea* (Asteraceae) were investigated. The objects of study are hybrid *Achillea* × *submicrantha* Tzvelev and its parent species, *A. micrantha* Willd. and *A. setacea* Waldst. et Kit.b. *A.* × *submicrantha* is habitually similar to *A. micrantha* however differs from its parent by yellowish-white flowers and wider leaves. The hybrid is less susceptible to oxidative stress, contains more green pigments, membrane and reserve lipids, which indicates its greater functional activity in comparison with the parent species. Using the method of artificial neural networks, it is shown that, according to the physiological and biochemical characteristics, *A.* × *submicrantha* is closer to *A. setacea*.

Keywords: Achillea, adaptation, hybrids, ecological features

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 6, с. 629–636

ЗООЛОГИЯ

УДК 598.2:576.895.1+591.111.1

ОСОБЕННОСТИ ПАРАЗИТИРОВАНИЯ СКРЕБНЕЙ *Polymorphus phippsi* (PALAEACANTHOCEPHALA: POLYMORPHIDAE) В КИШЕЧНИКЕ ПТИЦ БАРЕНЦЕВА МОРЯ

© 2021 г. М. М. Куклина*, @, В. В. Куклин*

**Мурманский морской биологический институт РАН, ул. Владимирская, 17, Мурманск, 183010 Россия*

@E-mail: MM_Kuklina@mail.ru

Поступила в редакцию 20.06.2019 г.
После доработки 13.02.2020 г.
Принята к публикации 13.02.2020 г.

Исследованы аспекты локализации, физиологии пищеварения и взаимоотношений с окончательными хозяевами скребней *Polymorphus phippsi* (Kostylew, 1922) (Palaeacanthocephala: Polymorphidae) из кишечника морских птиц (обыкновенной гаги *Somateria mollissima* (Linnaeus, 1758), гаги-гребенушки *Somateria spectabilis* (Linnaeus, 1758) и серебристой чайки *Larus argentatus* (Pontoppidan, 1763), обследованных в различных районах Баренцева моря. Установлено, что *P. phippsi* паразитируют в дистальном отделе тонкого кишечника птиц. Интенсивность инвазии у обыкновенной гаги составляет 82 ± 35.2 (5–282) экз., у гаги-гребенушки – 31.5 ± 18.9 (1–115) экз., у птенцов серебристой чайки – 2.4 ± 0.4 (1–4) экз. Отмечено наличие процессов мембранного пищеварения с участием протеаз и гликозидаз, протекающих на поверхности тегумента скребней *P. phippsi*. Показано, что в местах прикрепления скребней в слизистой кишечника птиц повышается активность протеаз, увеличивается интенсивность процессов полостного и мембранного пищеварения с участием протеаз и гликозидаз.

Ключевые слова: скребни, морские птицы, пищеварение, протеазы, гликозидазы

DOI: 10.31857/S1026347021060123

Скребни, или “колючеголовые черви”, используют в качестве окончательных хозяев позвоночных животных, в том числе, и птиц, а местом их локализации служит тонкий кишечник (Taraschewski, 2005). Благодаря наличию мощного прикрепительного аппарата – крупного хоботка с многочисленными и острыми кутикулярными крючьями – эти паразиты могут представлять определенную угрозу для здоровья и даже жизни своих хозяев. Результаты изучения гельминтофауны погибших птиц давали многим исследователям основание предполагать, что высокая зараженность скребнями могла быть причиной смерти животных (Белопольская, 1952; Кулачкова, 1979; Itämies *et al.,* 1980; Thieltges *et al.,* 2006; La Sala, Martorelli, 2007). В ходе экспериментального заражения скребнями *Filicollis anatis* (Schrank, 1788) установлены гистопатологические изменения в кишечнике домашних уток (Цветаева, 1959; Taraschewski, Hofmann, 1991). Авторы регистрировали в местах прикрепления скребней воспалительные реакции с участием лимфоцитов, гетерофилов и эозинофилов, нарушения целостности тканей и кровоподтеки, некротические процессы. При экспериментальном заражении скребнями *Polymorphus minutus* (Goeze, 1782) отмечено снижение концентраций общего белка и белковых фракций в сыворотке крови птенцов обыкновенной гаги (Hollmèn *et al.,* 1999). Следует заметить, что по результатам экспериментальных работ и в ходе изучения птиц из природных популяций авторы неоднократно подчеркивали, что все особи, зараженные скребнями, отставали в росте и развитии, а на их теле отсутствовали жировые отложения (Белопольская, 1952; Цветаева, 1959; Кулачкова, 1979; Taraschewski, Hofmann, 1991; Hollmèn *et al.,* 1999). Высказывались предположения, что указанные выше изменения в кишечнике зараженных птиц связаны с уменьшением абсорбции нутриентов хозяина, нарушением секреторной и моторной функций кишечника (Цветаева, 1959; Кулачкова, 1979; Hollmèn *et al.,* 1999). Существует мнение, что причина гибели птиц в результате заражения гельминтами опосредована – паразитарная инвазия может играть роль дополнительного стрессового фактора (Taraschewski, Hofmann, 1991; Hollmèn *et al.*, 1999; Trieltges *et al.*, 2006; Tourangeau *et al.*, 2019). Авторы предполагают, что паразитические черви,

в том числе и скребни, способные конкурировать с птицами за пищевые ресурсы и энергию на сложных этапах годового цикла хозяев (миграции, насиживание яиц и вскармливание птенцов, суровые условия зимовки и т.д.), потенциально могут привести к голоданию, снижению пищевого статуса и гибели.

Скребни *Polymorphus phippsi* (Kostylew, 1922) (Palaeacanthocephala: Polymorphidae) входят в состав гельминтофауны многих видов морских птиц, гнездящихся в разных регионах Баренцева моря (Белопольская, 1952; Куклин, Куклина, 2005; Галактионов, Атрашкевич, 2015; Куклин, 2017). В качестве промежуточного хозяина они используют ракообразных *Gammarus oceanicus* (Segerstråle, 1947) и *G. setosus* (Dementieva, 1931) (Куклин, Маслич, 2011; Галактионов, Атрашкевич, 2015), а морские птицы (обыкновенная гага, стеллерова гага, люрик, морской песочник, бургомистр, морская и серебристая чайки, полярная крачка) выступают в роли окончательных хозяев (Куклин, Куклина, 2005; Галактионов, Атрашкевич, 2015; Куклин, 2017). При этом для указанного вида червей обыкновенная гага представляет собой облигатного дефинитивного хозяина, остальные птицы выполняют роль факультативных и/или элиминативных хозяев (Галактионов, Атрашкевич, 2015).

По современным сводкам, высокие показатели заражения скребнями *P. phippsi* характерны для обыкновенной гаги, гнездящейся на побережье Восточного Мурмана Баренцева моря (Куклин, Куклина, 2005). У этих птиц в указанном районе отмечена тотальная зараженность *P. phippsi* с интенсивностью инвазии до 350 экз. В гельминтофауне чаек рода *Larus* скребни *P. phippsi* регистрируются редко и представлены единичными экземплярами (Куклин, Куклина, 2005; Куклин, 2017).

Изучение особенностей паразитирования скребней *P. phippsi* в кишечнике птиц Баренцева моря (обыкновенная гага, гага-гребенушка, птенцы серебристой чайки) стало целью работы. Основное внимание при проведении исследования уделялось таким аспектам, как определение локализации скребней в тонком кишечнике птиц, показателей заражения и стадии зрелости червей, измерение активностей пищеварительных ферментов и оценка влияния инвазии на процессы пищеварения хозяев.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал для настоящего исследования собран в ходе морских и береговых экспедиций. Обыкновенная гага *Somateria mollissima* (Linnaeus, 1758) (n = 10) и птенцы серебристой чайки *Larus argentatus* (Pontoppidan, 1763) (n = 11) добыты в июле 2008, 2010 и 2015 гг. в районе Восточного Мурмана на побережье Баренцева моря, гага-гребенушка *Somateria spectabilis* (Linnaeus, 1758) (n = 7) – в августе 2010 г. на острове Долгий Печорского моря.

Птиц вскрывали, вырезали желудочно-кишечный тракт, отделяли тонкий кишечник и желудок. По результатам анализа содержимого желудков птиц определяли рацион питания и рассчитывали относительную встречаемость пищевых объектов в желудках. Относительная встречаемость – это отношение количества встреч данной группы кормов к сумме встреч всех групп кормов.

Гельминтологическое вскрытие проводили по стандартным методикам (Галактионов и др., 1997; Куклин, 2013). Для всех обнаруженных скребней регистрировали место локализации в кишечнике птиц. Червей извлекали, подсчитывали их количество, а также определяли интенсивность инвазии (ИИ) – минимальное и максимальное количество особей паразита у каждого вида хозяев, среднее значение ИИ и ошибку среднего. Часть скребней использовали для определения систематического статуса, другую часть – для биохимического анализа.

Слизистая оболочка тонкого кишечника птиц двух видов (обыкновенной гаги и серебристой чайки) и скребни послужили материалом для биохимических исследований. При изучении процессов пищеварения, протекающих на поверхности кишечника птиц и тегумента скребней, использовали метод последовательной десорбции (Кузьмина, 1976). Участки кишечника и скребней помещали в 5 мл раствора Рингера для теплокровных животных и встряхивали в течение 30 с, получая фракцию $Д_1$ (ферменты из фракции $Д_1$ участвуют в полостном пищеварении). После этого участки кишечника и скребней переносили в 5 мл раствора Рингера и встряхивали в течение 45 мин, последовательно получая фракции $Д_2$, $Д_3$ и $Д_4$. Значения измеренных активностей ферментов во фракциях $Д_2$, $Д_3$ и $Д_4$ суммировали (в работе представлены как $Д_2$–$Д_4$). Ферменты из фракций $Д_2$–$Д_4$ участвуют в процессах мембранного пищеварения, протекающих на поверхности кишечника птиц и тегумента скребней. После получения фракций $Д_1$–$Д_4$ с участка кишечника снимали слизистую оболочку. Слизистую и скребней помещали в 5 мл раствора Рингера и гомогенизировали. Гомогенат слизистой кишечника птиц (Г) – это фракция, содержащая прочно фиксированные на энтероцитах кишечника ферменты, а гомогенат скребней – фракция, содержащая ферменты, прочно связанные с покровами паразитов, и ферменты их внутренних органов. Полученные фракции $Д_1$–$Д_4$, Г и слизистую кишечника замораживали, затем обрабатывали в лабораторных условиях.

Таблица 1. Относительная встречаемость кормовых объектов в желудках обследованных птиц, %

Кормовые объекты	Обыкновенная гага (n = 10)	Гага-гребенушка (n = 7)	Птенцы серебристой чайки (n = 11)
Двустворчатые моллюски	69.2	58.4	11.1
Полихеты	7.7	–	16.8
Гастроподы	–	8.3	–
Морские ежи	7.7	–	5.5
Рыба	7.7	–	11.1
Водоросли	7.7	33.3	–
Скорлупа яиц	–	–	5.5
Наземные растения	–	–	27.8
Насекомые	–	–	5.5
Пищевые отходы	–	–	16.7

В пробах измеряли активность пищеварительных ферментов – протеаз и гликозидаз. Активность протеаз (АП) (активность трипсина КФ 3.4.21.4, химотрипсина КФ 3.4.21.1 и дипептидаз КФ 3.4.13.1–3.4.13.11) определяли методом Ансона в модификации Л. Н. Алексеенко по приросту тирозина (Anson, 1938; Алексеенко, 1968). В качестве субстрата использовали 1%-ный раствор казеина. Активность гликозидаз (АГ) (суммарная активность амилазы КФ 3.2.1.1, глюко-амилазы КФ 3.2.1.3 и ферментов группы мальтаз КФ 3.2.1.20) измеряли по приросту гексоз модифицированным методом Нельсона (Уголев, Иезуитова, 1969). В качестве субстрата использовали 1.8%-ный раствор растворимого крахмала. Субстраты были приготовлены на растворе Рингера для теплокровных животных.

По итогам измерений был рассчитан коэффициент соотношения активности гликозидаз к активности протеаз – Г/П, который используется для характеристики пищеварительного процесса.

Обработка полученных данных выполнена с помощью статистического пакета Microsoft Excel и STATISTICA 10. Результаты представлены в виде средних значений и их ошибок. Достоверность различий между сравниваемыми параметрами определяли по непараметрическому критерию Уилкоксона и с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Изменения активностей пищеварительных ферментов в слизистой кишечника обыкновенной гаги в зависимости от ИИ скребнями оценивали с помощью корреляционного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе настоящего исследования установлено, что в рационе питания обыкновенной гаги и гаги-гребенушки доминирующее положение занимают двустворчатые моллюски (прежде всего мидии *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) (табл. 1). Спектр питания птенцов серебристой чайки широк и включает кормовые объекты как морского, так и наземного происхождения, а также пищевые отходы.

В результате гельминтологических вскрытий выявлено, что скребни *P. phippsi* локализуются в дистальном отделе тонкого кишечника у всех исследованных видов птиц. Обнаружено, что в тонком кишечнике у обыкновенной гаги и гаги-гребенушки встречаются как половозрелые, так и неполовозрелые скребни, а у птенцов серебристой чайки – только неполовозрелые особи. Подсчитано, что ИИ скребнями *P. phippsi* у обыкновенной гаги составляет 82 ± 35.2 (5–282) экз., у гаги-гребенушки – 31.5 ± 18.9 (1–115) экз., у птенцов серебристой чайки – 2.2 ± 0.4 (1–4) экз.

Биохимический анализ показал, что в местах прикрепления скребней в слизистой кишечника у всех исследованных видов птиц повышается активность протеаз (табл. 2). Увеличение активности гликозидаз отмечено в слизистой зараженных гаг-гребенушек (в 1.8 раза), а у птенцов серебристой чайки зарегистрировано снижение активности гликозидаз (в 2.4 раза) по сравнению с аналогичными показателями контрольных участков. Кроме того, значения коэффициента Г/П снижались в местах локализации скребней в кишечнике у всех видов птиц, особенно заметно величина коэффициента уменьшалась в тонком кишечнике птенцов серебристой чайки (в 3.75 раза) по сравнению с контролем.

Наряду с этим установлено, что интенсивность мембранного пищеварения ($Д_2$–$Д_4$) с участием протеаз и гликозидаз повышается в дистальном отделе кишечника обыкновенных гаг, инвазированных скребнями, по сравнению с контрольными показателями (табл. 3) ($p < 0.05$). Кроме того, в кишечнике уток, зараженных скребнями, про-

Таблица 2. Активность гликозидаз и протеаз в тонком кишечнике морских птиц

Морские птицы	Активность протеаз (ммоль тирозина/г мин)	Достоверность различий	Активность гликозидаз (ммоль глюкозы/г мин)	Достоверность различий *	Г/П
Обыкновенная гага	0.37 ± 0.03 / 0.62 ± 0.04*	$F_{3.9} = 12.6$, $p < 0.001$	0.72 ± 0.04 / 0.92 ± 0.05	$F_{3.9} = 2.6$, $p < 0.11$	1.9 / 1.5
Гага-гребенушка	1.3 ± 0.15 / 3.6 ± 0.59*	$F_{4.24} = 6.47$, $p < 0.017$	2.4 ± 0.36 / 4.3 ± 0.51*	$F_{4.24} = 4.97$, $p < 0.0035$	1.8 / 1.2
Серебристая чайка	2.2 ± 0.3 / 3.4 ± 0.29*	$F_{5.3} = 15.47$, $p < 0.001$	2.6 ± 0.2 / 1.1 ± 0.08*	$F_{5.3} = 13.3$, $p < 0.0013$	1.2 / 0.32

Примечание. Над чертой значения активностей ферментов в участках слизистой кишечника, где паразиты отсутствуют, под чертой – в участках, где локализуются паразиты; * – различия достоверны относительно значений активностей ферментов в участках слизистой кишечника, где паразиты отсутствуют.

цессы полостного пищеварения ($Д_1$) с участием ферментов гидролиза углеводов идут наиболее активно. В кишечнике птенцов серебристой чайки при заражении скребнями зарегистрировано протекание как мембранного ($Д_2$–$Д_4$), так полостного ($Д_1$) пищеварения с участием гликозидаз, при этом у чаек, свободных от инвазии скребнями, указанные процессы не отмечены (Куклина, Куклин, 2016). В гомогенате кишечника (Г) зараженных чаек отмечено значительное снижение активности гликозидаз (в 10.4 раза) по сравнению с контрольными параметрами ($p < 0.05$). В то же время в гомогенате обыкновенных гаг и серебристых чаек при инвазии скребнями активности протеаз увеличиваются в 2.7 и 4.0 раза соответственно относительно показателей контрольных участков ($p < 0.05$).

Установлено, что на тегументе скребней *P. phippsi* протекают процессы мембранного пищеварения с участием протеаз и гликозидаз (табл. 3). Сравнительный анализ показал, что на тегументе неполовозрелых скребней из кишечника и обыкновенной гаги, и серебристой чайки процессы мембранного пищеварения с участием протеаз осуществляются при одинаковой активности указанных ферментов. Активность же гликозидаз при мембранном пищеварении на тегументе скребней из кишечника чаек значительно превышает аналогичные показатели на покровах скребней из кишечника обыкновенной гаги ($p < 0.05$). В то же время выявлено снижение активности протеаз в теле (Г) неполовозрелых скребней из кишечника птенцов серебристой чайки более, чем в 2 раза, по сравнению с половозрелыми и неполовозрелыми скребнями из кишечника обыкновенной гаги ($p < 0.05$). Полученные данные свидетельствуют о том, что на поверхности тегумента ($Д_2$–$Д_4$) и в теле (Г) половозрелых скребней из кишечника гаги процессы пищеварения с участием гликозидаз протекают более интенсивно, чем у неполовозрелых скребней, паразитирующих в том же хозяине – активность гликозидаз в теле половозрелых скребней в 3.4 раза превышает значение аналогичного показателя для неполовозрелых особей ($p < 0.05$).

По результатам корреляционного анализа не установлено достоверной зависимости изменения активности протеаз и гликозидаз от количества скребней в кишечнике обыкновенной гаги. Коэффициент корреляции между АГ и ИИ скребнями составил 0.23, между АП и ИИ скребнями – 0.3.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Высокие показатели ИИ скребнями *P. phippsi* зарегистрированы для обыкновенной гаги и гаги-гребенушки, в то время как находки *P. phippsi* в кишечнике птенцов серебристой чайки единичны. Если следовать общим представлениям о связи между инвазией гельминтами и рационом питания животных, то часть содержимого желудков у исследованных птиц должны составлять ракообразные (Bustnes, Galaktionov, 2004; Skirnisson, 2015). Тем не менее, ракообразные в составе кормов исследованных гаг и чаек не обнаружены. Вероятно, заражение скребнями произошло намного раньше отлова птиц, а остатки раков быстро переварились. По всей видимости, инвазия скребнями *P. phippsi* с высокими показателями заражения у гаг по сравнению с серебристыми чайками может быть связана, в первую очередь, с пищевыми

Таблица 3. Активности протеаз и гликозидаз во фракциях, десорбируемых с поверхности пищеварительно-транспортных систем птиц и тегумента скребней

Поверхность	Хозяин	$Д_1$	$Д_{2-4}$	Г
Активность протеаз (ммоль тирозина/г мин)				
Кишечник	Обыкновенная гага	0.19 ± 0.02 / 0.24 ± 0.01	0.1 ± 0.01 / 0.22 ± 0.01*	0.06 ± 0.005 / 0.16 ± 0.01*
Кишечник	Серебристая чайка	1.24 ± 0.1 / 1.9 ± 0.04*	0.84 ± 0.1 / 0.98 ± 0.1	0.15 ± 0.01 / 0.6 ± 0.02*
Тегумент (неполовозрелые скребни)	Обыкновенная гага	0.17 ± 0.08	0.23 ± 0.02	0.23 ± 0.03
Тегумент (половозрелые скребни)	Обыкновенная гага	0.24 ± 0.06	0.1 ± 0.01**	0.21 ± 0.02
Тегумент (неполовозрелые скребни)	Серебристая чайка	0.61 ± 0.04	0.18 ± 0.01	0.1 ± 0.01**
Активность гликозидаз (ммоль глюкозы/г мин)				
Кишечник	Обыкновенная гага	0.27 ± 0.01 / 0.55 ± 0.03*	0.25 ± 0.01 / 0.47 ± 0.02*	0.2 ± 0.01 / 0.17 ± 0.01
Кишечник	Серебристая чайка	0 / 0.53 ± 0.01	0 / 0.31 ± 0.01	2.6 ± 0.2 / 0.25 ± 0.01*
Тегумент (неполовозрелые скребни)	Обыкновенная гага	0.09 ± 0.05	0.02 ± 0.005	0.64 ± 0.15
Тегумент (половозрелые скребни)	Обыкновенная гага	0.21 ± 0.002	0.04 ± 0.001**	2.2 ± 0.007**
Тегумент (неполовозрелые скребни)	Серебристая чайка	0	0.53 ± 0.02**	0.94 ± 0.04

Примечание. Над чертой значения активностей ферментов в участках слизистой кишечника, где паразиты отсутствуют, под чертой – в участках, где локализуются паразиты; * – различия достоверны относительно значений активностей ферментов во фракциях кишечника, где паразиты отсутствуют; ** – различия достоверны относительно значений активностей ферментов во фракциях тегумента неполовозрелых скребней из кишечника обыкновенной гаги.

предпочтениями птиц. По данным литературы, рацион питания обыкновенной гаги и гаги-гребенушки в Баренцеморском регионе включает главным образом мидий, а также иглокожих, полихет и ракообразных (Состояние ..., 2003). В то же время серебристые чайки очень пластичны в плане выбора кормовых объектов (Состояние ..., 2003). Представленные нами данные даже по небольшому числу обследованных птенцов серебристой чайки также свидетельствуют об их широком спектре питания. Дефицит одного из видов корма серебристые чайки могут с легкостью заменить на другие объекты питания как морского, так и наземного происхождения. Гаги не обладают такой способностью, и их кормовые территории, как правило, ограничены зоной морской литорали и сублиторали (Состояние ..., 2003).

Кроме того, в кишечнике обыкновенной гаги и гаги-гребенушки обнаружены как половозрелые, так и неполовозрелыми скребни, в то время, как в кишечнике птенцов серебристой чайки – только неполовозрелые особи. Указанные различия могут быть связаны со специфичностью гельминтов к окончательным хозяевам, особенностями пищеварения птиц, их рационом и, соответственно, количеством питательных веществ, необходимых для нормального развития скребней до половозрелого состояния. При этом сравнительный анализ показал, что активность протеаз в теле неполовозрелых скребней *P. phippsi* из кишечника птенцов серебристых чаек в два раза ниже активности протеаз в теле скребней *P. phippsi* из кишечника обыкновенной гаги независимо от стадии зрелости червей. Согласно данным научной литературы, влияние протеаз вызывает лизис тканей и образование капсул в кишечной стенке специфичных хозяев, что способствует более прочной фиксации гельминтов (Polzer, Taraschewski, 1994). Можно предположить, что низкая активность протеолитических ферментов в теле скребней *P. phippsi*, найденных у чаек, препятствует их глубокому закреплению в кишечнике этих птиц, что, возможно, также приводит к замедлению развития гельминтов. Вероятно, это может быть одной из причин, по

которой скребни *P. phippsi* редко достигают половой зрелости в кишечнике чаек рода *Larus* и не могут эффективно использовать их в качестве облигатных дефинитивных хозяев (Галактионов, Атрашкевич, 2015).

Независимо от вида хозяина и стадии зрелости скребни *P. phippsi* паразитируют в дистальном отделе тонкого кишечника. Ранее замечено, что дистальный отдел кишечника птиц обладает наиболее стабильными условиями для жизнедеятельности гельминтов (Crompton, Nesheim, 1976; Куклина, Куклин, 2019). Кроме того, неоднократно отмечалось, что местоположение скребней в желудочно-кишечном тракте позвоночных животных ограничено областью, в которой активно протекают процессы абсорбции нутриентов (моносахаридов, аминокислот и т.д.), а также может определяться конкурентными взаимоотношениями с другими видами гельминтов (Crompton, Nesheim, 1976; Holmes, 2002). Следует заметить, что в местах локализации *P. phippsi* процессы полостного и мембранного пищеварения с участием протеаз и гликозидаз в кишечнике исследованных птиц протекают с высокой интенсивностью. Можно предположить, что заражение скребнями приводит к активации процессов полостного и мембранного пищеварения в кишечнике хозяина, и тем самым черви дополнительно обеспечивают себя доступными питательными веществами, необходимыми для существования.

Известно, что пищеварительная система у скребней отсутствует, и питательные вещества они поглощают всей поверхностью тела (Hibbard, Cable, 1968; Taraschewski, Mackenstedt, 1991). Результаты представленного исследования показали, что на поверхности тегумента скребней адсорбируются пищеварительные ферменты хозяина и протекают процессы мембранного пищеварения с участием протеаз и гликозидаз. При этом активность протеаз у неполовозрелых особей выше аналогичного показателя половозрелых скребней, что, вероятнее всего, связано с тем, что молодым скребням необходимо больше питательных веществ и энергии для роста, развития и полового созревания.

Влияние инвазии скребнями на активность протеаз и гликозидаз в слизистой дистального отдела морских птиц заслуживает отдельного рассмотрения. Хоботок скребней *P. phippsi* вооружен 14–18 рядами кутикулярных крючьев (по 5–7 крючьев в ряду), длина острия которых составляет 0.046–0.071 мм (Хохлова, 1986). При этом хоботок половозрелых особей внедряется в кишечник птиц вплоть до серозной оболочки (Taraschewski, 2000; Г. И. Атрашкевич, личное сообщение). Механическое повреждение мембран энтероцитов крючьями скребней приводит к выходу внутриклеточных ферментов, что, видимо, в итоге и приводит к повышению значений активности протеаз в слизистой кишечника птиц. Аналогичные изменения активности пищеварительных ферментов ранее отмечены у позвоночных животных (рыб и птиц), в кишечнике которых паразитировали ленточные черви, обладающие прикрепительным аппаратом заякоривающего типа (Извекова, Куклина, 2014). Динамика активности гликозидаз была более сложной – в кишечнике гаг-гребенушек этот показатель увеличивался, у серебристых чаек снижался, у обыкновенных гаг не претерпевал статистически достоверных изменений (табл. 2). Возможно, это связано со степенью «притертости» взаимоотношений в системе паразит – хозяин, соотношением количества молодых и половозрелых скребней в каждой особи птиц и временем, прошедшем с момента заражения до начала проведения исследований. Следует также отметить, что адсорбция ферментов гидролиза углеводов активнее протекает на тегументе неполовозрелых скребней.

* * *

Установлено, что скребни *P. phippsi* паразитируют в дистальном отделе кишечника морских птиц (обыкновенной гаги, гаги-гребенушки, серебристой чайки). Высокие показатели ИИ *P. phippsi* зарегистрированы для обоих видов гаг, в которых гельминты достигают половозрелого состояние. В кишечнике птенцов серебристой чайки обнаружены лишь неполовозрелые особи *P. phippsi* в небольшом количестве (1–4 экз.). Независимо от стадии зрелости и систематического статуса хозяина, на поверхности тегумента скребней протекают процессы мембранного пищеварения с участием протеаз и гликозидаз. Кроме того, при инвазии скребнями в слизистой кишечника у всех видов птиц повышается активность протеаз, активируются процессы полостного и мембранного пищеварения с участием протеаз и гликозидаз. Следует заметить, что особенности инвазий и паразитирования скребней *P. phippsi* определяются рационом питания хозяина, а также пищеварительной активностью ферментов.

Работа выполнена в рамках государственного задания ММБИ РАН.

Авторы выражают благодарность администрации и сотрудникам Кандалакшского государственного природного заповедника за помощь в проведении полевых работ, заведующему лабораторией экологии гельминтов Института биологических проблем Севера ДВО РАН Г.И. Атрашкевичу за помощь в подготовке рукописи и ценные указания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Алексеенко Л.Н. Определение активности протеиназ по расщеплению белковых субстратов // Совр. методы в биохимии. М.: Медицина, 1968. Т. 2. С. 117.

Белопольская М.М. Паразитофауна морских водоплавающих птиц // Учен. записки ЛГУ. 1952. Вып. 28. № 141. С. 127–180.

Галактионов К.В., Куклин В.В., Ишкулов Д.Г., Галкин А.К., Марасаев С.Ф., Марасаева Е.Ф., Прокофьев В.В. К гельминтофауне птиц побережья и островов Восточного Мурмана (Баренцево море) // Экология птиц и тюленей в морях северо-запада России. Апатиты, 1997. С. 67–153.

Галактионов К.В., Атрашкевич Г.И. Специфика циркуляции паразитов морских птиц в высокой Арктике на примере паразитарной системы скребня *Polymorphus phippsi* (Palaeacanthocephala: Polymorphidae) // Паразитология. 2015. Т. 49. № 6. С. 393–411.

Извекова Г.И., Куклина М.М. Заражение цестодами и активность пищеварительных гидролаз позвоночных животных // Успехи соврем. биологии. 2014. Т. 134. № 3. С. 304–315.

Кузьмина В.В. Применение метода последовательной десорбции α-амилазы с отрезка кишки при изучении мембранного пищеварения у рыб // Вопр. ихтиологии. 1976. Т. 16. С. 944–946.

Куклин В.В. Модифицированная методика изготовления тотальных препаратов паразитических плоских червей // Рос. паразитологический журнал. 2013. № 4. С. 66–67.

Куклин В.В. Комплексный и сравнительный анализ гельминтофауны массовых видов колониальных морских птиц Мурманского побережья // Зоологический журнал. 2017. Т. 96. № 1. С. 3–20.

Куклин В.В., Куклина М.М. Гельминты птиц Баренцева моря: фауна, экология, влияние на хозяев. Апатиты: Изд-во Кольского научного центра РАН. 2005. 289 с.

Куклин В.В., Куклина М.М. Особенности локализации ленточных червей в тонком кишечнике серебристой чайки (*Larus argentatus*) // Зоологический журнал. 2019. Т. 98. № 3. С. 268–277.

Куклин В.В., Маслич М.А. Паразитофауна ракообразных семейства Gammaridae Мурманского побережья Баренцева моря // ДАН. 2011. Т. 477. № 5. С. 709–713.

Кулачкова В.Г. Гельминты как причина смертности обыкновенной гаги в вершине Кандалакшского залива // Экология и морфология гаг в СССР. М.: Наука, 1979. С. 119–125.

Состояние популяций морских птиц, гнездящихся в регионе Баренцева моря / Под ред. Анкер-Нильссена Т., Бакена В., Стрема Х., Головкина А.Н., Бианки В.В., Татаринковой И.П. Тромсе: Норвежский полярный ин-т., 2003. 216 с.

Уголев А.М., Иезуитова Н.Н. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз / Исследование пищеварительного аппарата у человека (обзор современных методов). Л.: Наука, 1969. С. 187–192.

Хохлова И.Г. Акантоцефалы наземных позвоночных животных фауны СССР. М.: Наука, 1986. 272 с.

Цветаева Н.П. Патоморфологические изменения в кишечнике уток при филиколлезе // Труды ВИГИС. 1959. Т. 6. С. 338–346.

Anson M. The estimation of pepsin, tripsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J. Gener. Phys. 1938. V. 22. № 1. P. 79–89.

Bustnes J.O., Galaktionov K.V. Evidence of a state-dependent trade-off between energy intake and parasite avoidance in Steller`s eiders // Canad. J. Zool. 2004. V. 82. P. 1566–1571.

Crompton D.T.W., Nesheim M.C. Host-parasite relationships in the alimentary tract of domestic birds // Adv. Parasitology. 1976. V. 14. P. 95–194.

Itämies J., Valtonen E.T., Fagerholm H.-P. Polymorphus minutus (Acanthocephala) infestation in eiders and its role as a possible cause of death // Ann. Zool. Fennici. 1980. V. 17. P. 285–289.

Hibbard K.M., Cable R.M. The uptake and metabolism of tritiated glucose, tyrosine, and thymidine by adult *Paulisentis fractus* Van Cleave and Bangham, 1949 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) // J. Parasit. 1968. V. 54. № 3. P. 517–523.

Hollmèn T., Lehtonen J.T., Sankari S., Soveri T., Hario M. An experimental study on the effects of polymorphiasis in common eider ducklings // J. Wildlife Diseases. 1999. V. 35. № 3. P. 466–473.

Holmes J.C. Effects of concurrent infections on *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) and *Moniliformis dubius* (Acanthocephala). I. General effects and comparison with crowding // J. Parasitol. 2002. V. 88. № 3. P. 434–439.

La Sala L.F., Martorelli S.R. Intestinal acanthocephaladiosis in Olrog's Gulls (*Larus atlanticus*): *Profilicollis chasmagnathi* as possible cause of death // J. Wildlife Diseases. 2007. V. 43. № 2. P. 269–273.

Polzer M., Taraschewski H. Proteolytic enzymes of *Pomphorhynchus laevis* and in three other acanthocephalan species // J. Parasitol. 1994. V. 80. № 1. P. 45–49.

Skimisson K. Association of helminth and food consumption in common eiders *Somateria mollissima* in Iceland // J. Sea Research. 2015. V. 104. P. 41–50.

Taraschewski H. Host-parasite interactions in Acanthocephala. a morphological approach // Advan. Parasitol. 2000. V. 46. P. 1–176.

Taraschewski H. Acanthocephala (throrny or spiny-headed worms) // Marine parasitology. Ed. *K. Rohde*. 2005. P. 116–121.

Taraschewski H., Hofmann U. Host-parasite interface of *Filicollis anatis* (Palaeacanthocephala) in domestic ducks // Diseas. Aquat. Organisms. 1991. V. 11. P. 155–162.

Taraschewski H., Mackenstedt U. Autoradiographic and morphological investigations on the uptake and incorporation of tritiated lysin by acanthocephalans // Parasit. Research. 1991. V. 77. P. 536–541.

Thieltges D.W., Hussel B., Baeckgarad H. Endoparasites in common eiders *Somateria mollissima* from birds killed by an oil spill in the northern Wadden Sea // J. Sea Researsh. 2006. V. 55. P. 301–308.

Tourangeau J., Provencher J.F., Gilchrist H.G., Mallory M.L., Forbes M.R. Sources of variation in endohelminth parasitism of common eiders over-wintering in the Canadian Arctic // Polar Biology. 2019. V. 42. № 2. P. 307–315.

The Peculiarities of Parasiting *Polymorphus phippsi* (Palaeacanthocephala: Polymorphidae) in the Intestines of Seabirds in the Barents Sea

M. M. Kuklina[1, #] and V. V. Kuklin[1]

[1]*Murmansk Marine Biological Institute RAS, Vladimirskaya str. 17, Murmansk, 183010 Russia*
[#]*e-mail: MM_Kuklina@mail.ru*

Aspects of localization, physiology of digestion and relationships with the final hosts of the acanthocephalan *Polymorphus phippsi* (Kostylew, 1922) (Palaeacanthocephala: Polymorphidae) from the intestines of seabirds (common eider *Somateria mollissima* (Linnaeus, 1758), comb eider *Somateria spectabilis* (Linnaeus, 1758) and herring gull *Larus argentatus* (Pontoppidan, 1763) from various regions of the Barents Sea are examined. It was established that *P. phippsi* parasitizes in the distal small intestine of birds. The invasion intensity in common eider is 82 ± 35.2 (5–282) specimens, in comb eider – 31.5 ± 18.9 (1–115), in chicks of herring gull – 2.4 ± 0.4 (1–4). The membrane digestion processes involving proteases and glycosidases occurring on the surface of the tegument of *P. phippsi* were noted. It is shown that the proteases activity increases at the sites of attachment of acanthocephalans in the intestinal mucosa of birds, and the intensity of the processes of cavity and membrane digestion with the participation of proteases and glycosidases increases.

Keywords: acanthocephalans, seabirds, digestion, proteases, glycosidases

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 6, с. 637–643

ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

УДК 597.552-1.05

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ЛИЗОЦИМА У ЩУКИ *Esox lucius* L. РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА

© 2021 г. М. Ф. Субботкин*, @, Т. А. Субботкина*

**Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Ярославская обл., Некоузский р-н, пос. Борок, 152742 Россия*

@E-mail: smif@ibiw.ru

Поступила в редакцию 13.08.2019 г.
После доработки 30.04.2021 г.
Принята к публикации 14.05.2021 г.

Анализировали концентрацию лизоцима в иммунных органах щуки: почках, селезенке и печени, а также в сыворотке крови. Обнаружена противоположная направленность внутригодовой флуктуации показателя неспецифического иммунитета в почках и селезенке относительно печени и сыворотки. Наиболее высокий уровень фермента в почках наблюдался в зимние месяцы и весной, а в сыворотке – с весны до осени. В мае месяце во всех исследованных органах и сыворотке наблюдалось значительное повышение концентрации лизоцима, независимо от направленности изменений в предшествующий период. Размеры особей не влияли на концентрацию лизоцима в органах, и только в сыворотке обнаружена корреляция с длиной рыб. Стадии зрелости гонад у щуки показали разнонаправленное влияние на концентрацию фермента в почках и сыворотке. Внутригодовая динамика показателя неспецифического иммунитета у взрослых рыб имеет сезонную зависимость, в том числе от температуры водоема. В печени и сыворотке крови связь фермента с температурой прямая, а в почках и селезенке обратная. Исследования показали, что сезонная динамика концентрации лизоцима щуки находится под влиянием совокупности параметров, характеризующих физиологическое состояние рыб, и факторов внешней среды. Сывороточный лизоцим оказался более зависимым от разных факторов, чем фермент из органов.

Ключевые слова: лизоцим, органы, сыворотка, щука, сезон

DOI: 10.31857/S1026347021060160

В условиях интенсивного развития мировой аквакультуры существует необходимость разработки мероприятий для защиты коммерческой продукции от больших потерь из-за болезней и других негативных воздействий, возникающих при выращивании рыб. Одним из путей решения таких задач является воздействие на иммунитет с целью его повышения или улучшения. Неспецифический иммунитет рыб является первой и эффективной линией защиты от неблагоприятных факторов внешнего воздействия. Лизоцим – фермент из группы гликозидаз – один из важных компонентов неспецифической резистентности, который наиболее активно изучается у этой группы животных. Считается, что повышенная концентрация или активность иммунных показателей может свидетельствовать о хорошем или эффективном иммунитете. Однако стимулирование повышения иммунитета вызывает и повышение энергетических затрат организма (Kortet, Vainikka, 2008). Ресурсы организма ограничены, и в этой связи важно понимание того, как происходит их перераспределение между необходимым иммунным ответом и другими жизненно важными физиологическими функциями (Viney *et al.,* 2005). Результаты экспериментов по влиянию разных факторов на иммунитет рыб, и в частности на активность или концентрацию лизоцима, различны. Также показано, что значительные вариации активности лизоцима могут быть и у контрольных рыб, на которых не действовал изучаемый фактор (Kozinska, Guz, 2004; Yin *et al.,* 2009; Kaleeswaran *et al.*, 2011; Das *et al.,* 2013). Количественные показатели иммунитета у рыб не постоянны и существенно варьируют в их жизненном цикле. Поэтому для адекватной оценки результатов воздействия на иммунные функции необходимо учитывать физиологическое состояние и характер нормальных количественных изменений показателей иммунитета у изучаемых рыб. Анализ сезонной или внутригодовой флуктуации показателей, которая проходит под влиянием максимально полного спектра внешних и внутренних факторов, позволяет выявить направленность и масштаб таких преобразований у рыб.

Список рыб, выращиваемых в аквакультуре, постоянно расширяется за счет новых и перспек-

Таблица 1. Время сбора и характеристика исследованных рыб

Время лова, мес.	Количество рыб, экз.	Стадия зрелости	Длина (l), см min–max / $M \pm m$	Масса общая, г min–max / $M \pm m$
Июнь	7	I, II	30–54.5 / 38.8 ± 3.0	230–1350 / 570.0 ± 138.3
Июль	8	I, II	28–44.8 / 36.1 ± 2.0	200–752 / 372.4 ± 81.5
Сентябрь	6	II, II–III	39–44.5 / 41.1 ± 1.1	435–760 / 584.2 ± 52.8
Октябрь	12	II, II–III	37–52 / 47.0 ± 1.8	442–1410 / 747.4 ± 128.4
Декабрь	15	II–III	48–65 / 52.1 ± 1.2	Нет данных
Январь	20	II–III	41.5–61 / 55.5 ± 1.2	510–1900 / 1014.0 ± 92.5
Февраль	8	II–III, III	38.5–56.5 / 48.8 ± 2.2	452–1345 / 860.5 ± 105.4
Март	14	III–IV	47–75 / 56.9 ± 2.5	670–3770 / 1667.1 ± 270.0
Апрель	13	IV, IV–V	39–65 / 52.3 ± 1.8	515–2270 / 1047.0 ± 139.6
Май	7	I, II, IV	33–54 / 41.4 ± 2.7	280–1100 / 640.0 ± 110.9

тивных видов. Щука *Esox lucius* L., 1758 рассматривается как один из таких объектов в некоторых хозяйствах России (Маслова, Петрушин, 2013; Скворцова и др., 2018). Искусственное разведение щуки началось в 70-х гг. прошлого столетия и получило наибольшее развитие в ряде европейских стран (Harvey, 2009). Несмотря на то, что щука широко распространена в водоемах северного полушария и относится к объектам аквакультуры, ее неспецифический иммунитет, включая такой важный иммунный показатель как лизоцим, изучен крайне слабо. Некоторые исследования, связанные с паразитарными инвазиями у вида, отражают распространение этого фермента в кишечнике и других органах, а также реакции рыб на наличие или отсутствие гельминтов (Извекова и др., 2010; Dezfuli *et al.*, 2018).

Цель представленной работы – изучить динамику концентрации лизоцима в иммунных органах и сыворотке крови щуки в разные сезоны годового цикла, с гонадами на разных стадиях развития, в естественных условиях обитания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Щуку отлавливали в прибрежной зоне Рыбинского водохранилища около пос. Борок и в р. Сутка, в районе с. Верхне-Никульское. В теплые месяцы образцы крови отбирали на месте, сразу же после вылова рыбы. Затем рыб помещали в термос со льдом и доставляли в лабораторию. В зимние месяцы отбор образцов проводили в лаборатории, куда рыбу доставляли в живом виде, сразу после вылова. Перед отбором крови рыбу обездвиживали резким ударом по голове. Кровь брали из хвостовых сосудов. Образцы сыворотки крови, тканей печени, почек и селезенки до анализа хранили замороженными при –18°С в течение нескольких суток. Проводили неполный биологический анализ: рыб взвешивали, измеряли длину до конца чешуйного покрова, определяли стадии зрелости гонад (Сакун, Буцкая, 1963). В исследовании представлены рыбы трехлетних сборов в количестве 110 особей (табл. 1).

Концентрацию лизоцима в тканях печени, почек, селезенки и сыворотке определяли методом “диффузии в агар”, который основан на способно-

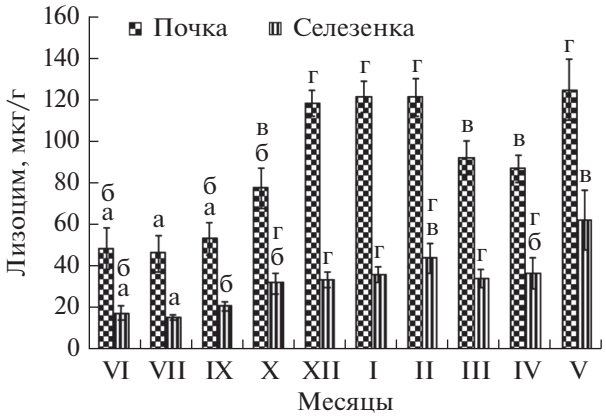


Рис. 1. Динамика лизоцима в почках и селезенке щуки (среднее ± стандартная ошибка). Разные буквы (а–г) над столбцами обозначают достоверные различия для одного и того же органа ($p < 0.05$).

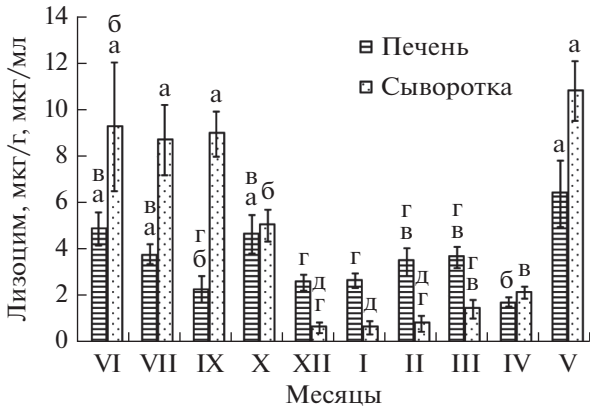


Рис. 2. Динамика лизоцима в печени и сыворотке щуки (среднее ± стандартная ошибка). Разные буквы (а–д) над столбцами обозначают достоверные различия для одного и того же органа или ткани ($p < 0.05$).

сти этого фермента лизировать клетки *Micrococcus lysodeikticus* (Schroeter 1872), диспергированные в слое агарового геля. Диаметр зоны просветления пропорционален логарифму концентрации лизоцима (Osserman, Lawlor, 1966). Концентрацию фермента в исследуемых образцах определяли по калибровочной кривой на основе стандартного препарата из белка куриных яиц. Более подробно метод описан ранее (Субботкина, Субботкин, 2003). Концентрацию лизоцима выражали в мкг/г ткани органа и мкг/мл сыворотки как средняя ± ± стандартная ошибка. Для сравнения выборок применяли непараметрический критерий Манна–Уитни, а корреляционные связи определяли по критерию Спирмена (r_s) при значимости $p < 0.05$. Возможное влияние некоторых факторов на лизоцим щуки оценивали по критерию Краскела–Уоллиса (H) при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Внутригодовая флуктуация концентрации лизоцима в почках щуки имела существенные сезонные различия, при которых максимальные значения в 2.5 раза превышали минимальные. Летом (в июне–июле) в тканях органа зарегистрирован наименьший уровень лизоцима (рис. 1). С осени количество фермента нарастало и достигло максимума зимой. В почках щуки обнаружены два периода самых высоких концентраций лизоцима. Первый, наиболее продолжительный период, охватывал три зимних месяца декабрь, январь и февраль. Затем весной концентрация лизоцима снижалась и вновь возрастала до максимума в мае.

В селезенке в летний период, также как в почках, обнаружена самая низкая концентрация лизоцима (рис. 1). Более высокий и одинаковый уровень фермента в тканях этого органа наблюдался в течение длительного времени – с октября до мая месяца. В мае у рыб также были самые высокие концентрации лизоцима, средние значения которых отличались от таковых в предыдущие весенние месяцы и последующие летний и осенний период.

В печени щуки обнаружен скачкообразный характер изменений концентрации лизоцима (рис. 2). Наиболее значительные различия такого плана наблюдались в осенний и весенний периоды. В начале осени концентрация фермента в органе снизилась по сравнению с июлем, но уже в октябре было зарегистрировано ее двукратное повышение. В зимний период количество фермента в печени сохранялось на пониженном уровне. В феврале–марте наблюдалось незначительное (на 40%) повышение уровня лизоцима. Однако в апреле наблюдалось более чем двукратное снижение концентрации этого показателя неспецифического иммунитета. Конец весны и начало лета характеризовались самыми высокими значениями параметра, когда концентрация лизоцима в печени более чем в 2.5–3 раза превышала апрельский уровень.

Сыворотка щуки в исследованный период продемонстрировала самый широкий диапазон внутригодовой флуктуации концентрации лизоцима (рис. 2). Летний период и начало осени характеризовались очень высоким содержанием фермента. В дальнейшем его концентрация снизилась до минимального уровня, который наблюдался в течение трех зимних месяцев. Наступление весны сопровождалось плавным ростом концентрации лизоцима, однако в мае произошел резкий скачок до максимальных годовых значений. В итоге самые высокие концентрации лизоцима, обнаруженные в течение продолжительного периода, включающего май, июнь, июль и сентябрь, оказались в 10–13 раз выше значений зимнего периода.

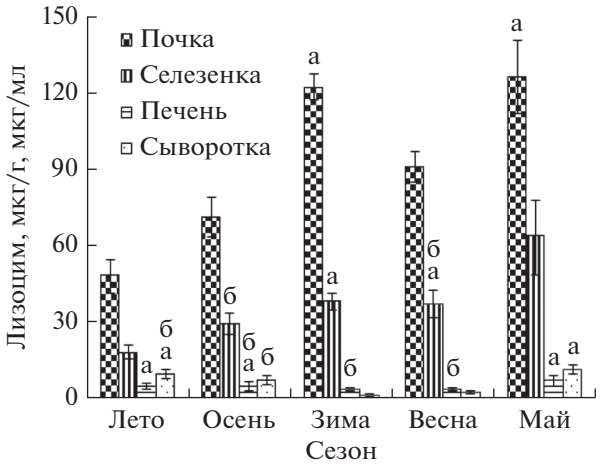


Рис. 3. Сезонная динамика лизоцима в органах и сыворотке щуки (среднее ± стандартная ошибка). Отсутствие букв и разные буквы (а, б) над столбцами обозначает достоверные различия для одного и того же органа или ткани ($p < 0.05$).

Анализ данных показал, что концентрация фермента в органах и сыворотке внутри сезонов во многих случаях более сходна, чем в разные сезоны, исключение – месяц май, когда количество лизоцима у рыб отличалось от предыдущего и последующего месяцев. Остальные данные были сгруппированы в сезоны (рис. 3). Показано, что для зимы и весны характерны самые высокие концентрации лизоцима в почках и селезенке, и напротив – самые низкие – в печени и сыворотке. Летом и осенью наблюдалось повышение концентрации фермента в печени и сыворотке, и понижение его в почках и селезенке. В мае концентрации фермента в почках и селезенке были сходными с холодным временем года, а в печени и сыворотке – с летнее-осенним периодом.

Полученные данные выявили общую положительную корреляцию средней силы между концентрациями лизоцима в почках и селезенке ($r_s = 0.6$). Однако между лизоцимом в почках и сыворотке обнаружена обратная зависимость ($r_s = -0.4$). Подобный, но более слабый, характер связи проявлялся между концентраций фермента в селезенке и сыворотке ($r_s = -0.21$). Печень, напротив, показала положительную, но также не высокую, корреляцию концентрации фермента с сывороткой ($r_s = 0.31$).

Изучение влияния сезонности на иммунитет диких рыб в природе позволяет установить диапазон естественной флуктуации иммунных показателей и способствует выяснению потенциала защитных возможностей организма. Исследования, которые проводятся в этой области, указывают на отсутствие общей закономерности иммунных реакций – у каждого вида рыб или группы родственных видов может быть свой, уникальный сезонный иммунный ответ (Субботкин, Субботкина, 2016; Papezikova *et al.*, 2016). Этот ответ, сформированный на основе биологических и физиологических возможностей организма, может быть результатом прямого или опосредованного влияния экологии.

Среди абиотических факторов окружающей среды важную роль в жизни пойкилотермных животных играет температура. Ее влияние на количественные характеристики лизоцима в крови рыб показано в экспериментальных условиях, тогда как результаты, полученные в естественной среде, не только неоднозначны, но и порой противоречивы (Kortet, Vainikka, 2008). Этот аспект обсуждался при рассмотрении сезонной динамики фермента у леща *Abramis brama* L., 1758 (Субботкин, Субботкина, 2016). Мы не определяли температуру воды непосредственно при отлове щуки, поскольку общий термический режим водохранилища известен (Буторин и др., 1982). Однофакторный анализ Краскела–Уоллиса выявил зависимость концентрации лизоцима от температуры воды в водоеме во всех исследованных тканях (табл. 2). Для лизоцима в почках и селезенке характерна обратная зависимость от температуры ($r_s = -0.54$ и $r_s = -0.39$ соответственно), тогда как фермент в печени и сыворотке, напротив, имел положительную связь ($r_s = 0.34$ и $r_s = 0.75$). Дифференцировка рыб по сезонам показала, что совокупность различных внешних факторов, действующих в рамках категорий “сезон”, также влияет на концентрацию лизоцима в органах и сыворотке щуки.

Возможность влияния физиологического состояния на иммунный показатель оценивали по биологическим параметрам щуки. Обнаружено, что концентрация фермента ни в одной исследованной ткани не связана с полом рыб ($p > 0.05$) (табл. 2). Другие морфо-физиологические показатели рыб широко варьировали в разные сезоны при разной температуре. Чтобы минимизировать влияние этих внешних факторов мы анализировали выборки зимнего и весеннего сезонов. В это время изменения температурного режима водоема и фактора сезонности проявляются в меньшей степени, чем в другие периоды. Для определения влияния размеров особи щуки были разделены по длине на две группы: I – от 38.5 до 50 см, II – от 55 до 75 см (табл. 3). Статистический анализ показал, что эти группы рыб различались в высшей степени по длине и массе ($p < 0.000$), тогда как по концентрации фермента были сходны ($p = 0.08$–0.97). Однофакторный анализ по критерию H не выявил влияния размеров рыб на концентрацию лизоцима в органах и сыворотке. Корреляция фермента наблюдалась только у сывороточного лизоцима с длиной рыб ($r_s = 0.31$; $p < 0.05$).

Таблица 2. Значения критерия Краскела-Уоллиса (*H*) для факторов и концентрации лизоцима в тканях щуки

Факторы	Показатели			
	Концентрация лизоцима			
	почки	селезенка	печень	сыворотка
Температура	40.130; $p = 0.000$*	31.893; $p = 0.000$*	17.643; $p = 0.001$*	68.379; $p = 0.000$*
Сезон	49.456; $p = 0.000$*	32.472; $p = 0.000$*	17.793; $p = 0.001$*	75.250; $p = 0.000$*
Пол	4.738; $p = 0.094$	5.800; $p = 0.055$	0.211; $p = 0.900$	3.072; $p = 0.215$
Стадии зрелости гонад	19.974; $p = 0.001$*	6.536; $p = 0.258$	4.567; $p = 0.471$	25.956; $p = 0.000$*

Примечание. * значимая связь концентрации лизоцима с фактором при $p < 0.05$.

Таблица 3. Показатели щуки в зимний и весенний сезоны ($M \pm m$)

Показатели	Группы	
	I	II
Длина (см)	46.5 ± 0.6 ($n = 26$)	60.6 ± 1.34 ($n = 19$)
Масса (г)	738.9 ± 34.0 ($n = 21$)	1898.8 ± 198.5 ($n = 16$)
Концентрация лизоцима:		
почки (мкг/г)	117.12 ± 6.68	109.58 ± 7.65
селезенка (мкг/г)	41.00 ± 4.44	38.24 ± 4.13
печень (мкг/г)	2.80 ± 0.30	2.89 ± 0.39
сыворотка (мкг/мл)	0.85 ± 0.24	1.53 ± 0.32

Возможное влияние стадий зрелости гонад на лизоцим у щуки также оценивали в зимне-весенний период. Было обнаружено, что концентрация фермента в почках и сыворотке зависела от стадий зрелости гонад по критерию Краскела-Уоллиса (табл. 2). Лизоцим в почках был связан со зрелостью гонад в обратной зависимости ($r_s = -0.50$), тогда как в сыворотке зависимость была прямая ($r_s = 0.54$). Между динамикой концентрации фермента в печени и селезенке и развитием гонад связь не обнаружена.

Разнонаправленные изменения концентрации лизоцима в исследованных тканях, которые могут быть зависимы от физиологических особенностей рыб (созревание гонад), а также внешнего воздействия (температура воды) указывают на то, что один источник – сыворотка или плазма крови, который анализируется значительно чаще других, не отражает динамику фермента во всем организме. Учитывая концентрацию лизоцима в почках и селезенке, которая у многих видов может значительно превышать таковую в крови (Субботкина, Субботкин, 2003; Субботкин, Субботкина 2016), исследование фермента только в сыворотке для оценки влияния каких-либо факторов на состояния иммунитета рыб оказывается недостаточным. Это подтверждается и определенной корреляционной связью лизоцима в сыворотке с его количеством в иммунных органах, обнаруженной у исследованной щуки.

Наличие высоких концентраций лизоцима в почках и селезенке в зимний период, с последующим снижением в летние месяцы, скачок уровня фермента до максимальных значений во всех исследованных тканях щуки в мае, вероятно, не может указывать на зависимость этого показателя от освещенности и продолжительности светового дня. Однако изменения отдельных факторов внешней среды, например, температуры или освещенности, могут выступать пусковым сигналом, вызывающим ответные реакций иммунной системы (Kortet, Vainikka, 2008).

Пиковые концентрации лизоцима, обнаруженные у щуки в мае, могут быть обусловлены посленерестовыми изменениями в организме рыб. Во внешней среде в это время происходит значительное повышение температуры воды (Буторин и др., 1982), что также может способствовать активизации иммунных реакций. Высокие значения фермента в зимние месяцы при низких температурах могут быть вызваны физиологическими преобразованиями, когда рыбы интенсивно накапливают резервы, необходимые для развития гонад. Например, лещ в отличие от щуки, входит в зимний период с хорошо сформированными половыми продуктами, и у него максимальные значения лизоцима обнаружены только в марте, на завершающем этапе зимовки (Субботкин, Субботкина, 2016).

Необходимо отметить, что при формировании половых продуктов у рыб могут существенно изменяться абсолютные и относительные размерно-массовые показатели как отдельных органов, включая иммунные, так и всего организма. Медфорд и Маккей (Medford, Mackay, 1978) указывали, что у щуки *E. lucius* вес печени более тесно связан с ростом гонад, чем с интенсивностью питания. Была показана корреляция гонадосоматического и гепатосоматического индексов щуки (Lenhardt, 1992). Сезонные различия печени наблюдались и у молоди щуки, с увеличением индексов весной по сравнению с предыдущей осенью (Bennett, Janz, 2007). Изменения размеров иммунных органов остались за рамками проведенных исследований, и их влияние на сезонную динамику лизоцима рыб не ясно. Взаимосвязь иммунной системы с физиологическим состоянием, в том числе половым созреванием и размножением, может быть более сложной, чем корреляции со зрелостью гонад.

* * *

Внутригодовая динамика концентрации лизоцима у щуки проявляется значительными флуктуациями в иммунных органах и сыворотке. Повышение концентрации лизоцима в почках почти в 3 раза, с 47.9 ± 6.4 мкг/г летом, до 121.6 ± 4.3 мкг/г зимой, происходит на фоне более чем 13-кратного снижения в сыворотке, с 9.0 ± 1.47 мкг/мл летом, до 0.68 ± 0.16 мкг/мл зимой. Обнаружены изменения, которые тесно связаны с сезонными факторами, в том числе с термическим режимом водоема. Концентрация фермента не зависит от пола и размеров рыб, но зрелость гонад влияет на лизоцим в почках и сыворотке.

Направленность и сила факторов, влияющих на количественный параметр лизоцима в исследованных тканях неодинакова, что свидетельствует о сложном характере взаимосвязи изменений во внешней среде и физиологических процессов в организме рыб. Сезонная динамика иммунного показателя отражает одно из направлений распределения внутренних ресурсов щуки между жизненно важными физиологическими функциями защиты организма и размножения, а также воздействиями условий обитания.

Направленность и сила факторов, влияющих на количественный параметр лизоцима в исследованных тканях неодинакова, что свидетельствует о сложном характере взаимосвязи изменений во внешней среде и физиологических процессов в организме рыб. Сезонная динамика иммунного показателя отражает одно из направлений распределения внутренних ресурсов щуки между жизненно важными физиологическими функциями защиты организма и размножения, а также воздействиями условий обитания.

Работа выполнена в рамках государственного задания (тема: АААА-А18-118012690222-4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Буторин Н.В., Курдина Т.Н., Бакастов С.С. Температура воды и грунтов Рыбинского водохранилища. Л.: Наука, 1982, 224 с.

Извекова Г.И., Субботкина Т.А., Субботкин М.Ф. Содержание лизоцима в организме щуки при заражении цестодами // Биол. внутр. вод. 2010. № 2. С. 73–76.

Маслова Н.И., Петрушин В.А. Рыбоводно-биологическая оценка щуки – перспективного объекта поликультуры // Состояние и перспективы развития пресноводной аквакультуры. Докл. международ. научно-практич. конф. 5–6 февраля 2013 г. М.: ВНИИР, 2013. С. 276–290.

Сакун О.Ф., Буцкая Н.А. Определение стадий зрелости и изучение половых циклов рыб // М.: Рыбное хозво, 1963, 36 с.

Скворцова Е.Г., Флёрова Е.А., Лозина Я.В. Выращивание щуки в различных рыбоводных хозяйствах // Вестник АПК Верхневолжья. 2018. № 4 (44). С. 42–47.

Субботкин М.Ф., Субботкина Т.А. Изменчивость содержания лизоцима у леща Рыбинского водохранилища в разные сезоны годового цикла // Изв. РАН. Сер. Биол. 2016. Т. 43. № 3. С. 309–314.

Субботкина Т.А., Субботкин М.Ф. Содержание лизоцима в органах и сыворотке крови у различных видов рыб р. Волги // Журн. эволюционной биохимии физиол. 2003. Т. 39. №. 5. С. 430–437.

Bennett P.M., Janz D.M. Seasonal changes in morphometric and biochemical endpoints in northern pike (*Esox lucius*), burbot (*Lota lota*) and slimy sculpin (*Cottus cognatus*) // Freshwater Biol. 2007. V. 52. № 10. P. 2056–2072.

Das B.K., Pradhan J., Sahu S., Marhual N.P., Mishra B.K., Eknath A.E. Microcystis aeruginosa (Kütz) incorporated diets increase immunity and survival of Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.) against *Aeromonas hydrophila* infection // Aquacult. Res. 2013. V. 44. № 6. P. 918–927.

Dezfuli B.S., Giari L., Lorenzoni M., Carosi A., Manera M., Bosi G. Pike intestinal reaction to *Acanthocephalus lucii* (Acanthocephala): immunohistochemical and ultrastructural surveys // Parasites Vectors. 2018. 11, 424.

Harvey B. A biological synopsis of northern pike (*Esox lucius*). Can. Manuscr. Rep. Fish. Aquat. Sci. 2009. 2885: 31 p.

Kaleeswaran B., Ilavenil S., Ravikumar S. Dietary supplementation with *Cynodon dactylon* (L.) enhances innate immunity and disease resistance of Indian major carp, *Catla catla* (Ham.) // Fish Shellfish. Immunol. 2011. V. 31. № 6. P. 953–962.

Kortet R., Vainikka A. Seasonality of innate immunity; evolutionary aspects and latest updates // New research on innate immunity / Eds: *Durand M., Morel C.V.; Nova Science Publishers Inc.*, 2008. P. 13–45.

Kozinska A., Guz L. The effect of various *Aeromonas bestiarum* vaccines on non-specific immune parameters and

protection of carp (*Cyprinus carpio* L.) // Fish Shellfish. Immunol. 2004. V. 16. № 3. P. 437–445.

Lenhardt M. Seasonal changes in some blood chemistry parameters and in relative liver and gonad weights of pike (*Esox lucius* L.) from the River Danube // J. Fish Biol. 1992. V. 40. № 5. P. 709–718.

Medford B.A., Mackay W.C. Protein and lipid content of gonads, liver, and muscle of northern pike (*Esox lucius*) in relation to gonad growth // J. Fish. Res. Board Can. 1978. V. 35. № 2. P. 213–219.

Osserman E.F., Lawlor D.P. Serum and urinary lysozyme (Muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia // J. Exp. Med. 1966. V. 124. № 8. P. 921–952.

Papezikova I., Mares J., Vojtek L., Hyrsl P., Markova Z., Simkova A., Bartonkova J., Navratil S., Palikova M. Seasonal changes in immune parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and brook trout × Arctic charr hybrids (*Salvelinus fontinalis* × *Salvelinus alpines alpinus*) // Fish Shellfish Immunol. 2016. V. 57. P. 400–405.

Viney M.E., Riley E.M., Buchanan K.L. Optimal immune responses: immunocompetence revisited // Trends Ecol. Evolut. 2005. V. 20. № 12. P. 665–669.

Yin G., Ardo L., Thompson K.D., Adams A., Jeney Z., Jeney G. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila* // Fish Shellfish. Immunol. 2009. V. 26. № 1. P. 140–145.

Seasonal Dynamics of Lysocyme in Pike *Esox lucius* L. of the Rybinsky Reservoir

M. F. Subbotkin[1, #] and T. A. Subbotkina[1]

[1]*Papanin Institute for Biology of Inland Water Biology, RAS, Borok, Nekouzskii raion, Yaroslavl oblast, 152742 Russia*

[#]*e-mail: smif@ibiw.ru*

The concentration of lysozyme in the immune organs of pike, kidney, spleen and liver, as well as in the blood serum was analyzed. The opposite direction of the intra-annual fluctuation of the nonspecific immunity indicator in the kidney and spleen relative to the liver and serum was found. The highest level of the enzyme in the kidney was observed during the winter months and spring, and in serum, from spring to autumn. In May, a significant increase in the lysozyme concentration was found in all studied organs and serum, regardless of the direction of changes in the previous period. The size of the individuals did not affect the lysozyme concentration in the organs, and the correlation with the fish length was found only in the serum. The stages of gonadal maturity in pike showed a multidirectional effect on the enzyme concentration in the kidney and serum. The intra-annual dynamics of the nonspecific immunity indicator in adult fish has a seasonal dependence, including on the water temperature in the water body. In the liver and serum, the relationship between the enzyme and temperature is direct, and it is opposite in the kidney and spleen. The studies have shown that the seasonal dynamics of the lysozyme concentration in pike is influenced by a set of parameters characterizing the physiological state of fish and environmental factors. Serum lysozyme was found to be more dependent on various factors than the enzyme from organs.

Keywords: lysozyme, organs, serum, pike, season

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 6, с. 644–650

ЭКОЛОГИЯ

УДК 574.52

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНЫХ ТРАНСФОРМАЦИЙ ФИТОПЛАНКТОНА КРУПНЫХ РЕК ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ В УСЛОВИЯХ ГЛОБАЛЬНОГО ИЗМЕНЕНИЯ КЛИМАТА

© 2021 г. В. А. Габышев@

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, пр. Ленина, 41, Якутск, 677980 Россия

@E-mail: v.a.gabyshev@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.11.2019 г.
После доработки 12.04.2021 г.
Принята к публикации 12.04.2021 г.

С применением метода искусственной нейронной сети, а также подхода пространственно-временного замещения, оценены основные пути возможной трансформации фитопланктона крупных рек Восточной Сибири в условиях глобальных климатических изменений. Определено, что при сохранении тенденции к увеличению безледного периода на субарктических реках, вероятным ответом планктонных сообществ водорослей, будет: 1) возрастание численности и рост риска “цветения” воды, 2) увеличение числа видов за счет инвазий, 3) снижение размерных показателей клеток фитопланктона, 4) сокращение числа монотипных таксонов в составе флоры. Водные экосистемы исследованных нами рек сохраняют неимпактный характер, что позволило оценить влияние климатических изменений, а не локальных антропогенных факторов.

Ключевые слова: фитопланктон, прогнозная модель, глобальное изменение климата, безледный период, крупные реки, Восточная Сибирь

DOI: 10.31857/S1026347021060081

В течение XX в. среднегодовая температура у поверхности Земли увеличилась на 0.6°, для Арктики этот показатель выше почти в два раза и, как прогнозируется, увеличится еще на 4–7°C в течение этого столетия (Field *et al.,* 2014). Высокая чувствительность к климатическим изменениям структуры сообществ внутренних вод, по сравнению с таковыми морских и наземных, была отмечена исследователями ранее (Strayer, Dudgeon, 2010). Широко обсуждаются вопросы, связанные с воздействием климатических параметров на структуру водорослевых сообществ континентальных водоемов (Winder, Sommer, 2012; Iatskiu *et al.*, 2018). Для построения моделей структуры сообществ по градиенту климата, исследование должно опираться на данные в масштабе гамма-разнообразия (Heino *et al.*, 2009). Современные работы в этом направлении проведены на примере водных сообществ Южной Америки (Schiaffino *et al.*, 2011), бореальных озер Европы (Angeler, Drakare, 2013). Актуальность исследований по разработке моделей климат-сообщество подтверждается возможностью их применения для решения важной проблемы экологии – прогнозированию реакции пресноводных сообществ на климатические изменения. По мнению ряда авторов, трансформация, вызванная глобальными климатическими изменениями, может быть наиболее драматичной для арктических регионов (Frey, McClelland, 2009). Несмотря на это, для северных континентальных водоемов ощущается недостаток исследований, посвященных изучению структуры водорослевых сообществ в градиенте климата.

Одним из важных факторов среды, связанных с режимом температуры воздуха, признается продолжительность безледного периода на водных объектах и, как следствие – вегетационного периода (Magnuson *et al.*, 2000). Рост продолжительности отсутствия льда на различных водных объектах Азиатской России с 1980 по 2014 гг. составил, в среднем, от 4.63 до 11 сут за десятилетие (Vuglinsky, Valatin, 2018). Прогноз на ближайшие десятилетия подтверждает сохранение этой тенденции (Field *et al.*, 2014). Регулирующая роль этого фактора была подтверждена нами ранее. При исследовании флористической и ценотической структуры речного фитопланктона в масштабе гамма-разнообразия была определена статистически значимая связь между продолжительностью безледного периода на реках Восточной Сибири и численностью водорослей планктона, числом видов в пробе, средним объемом клеток, а также флористическими пропорциями (отношение числа видов к числу семейств) (Габышев, Габы-

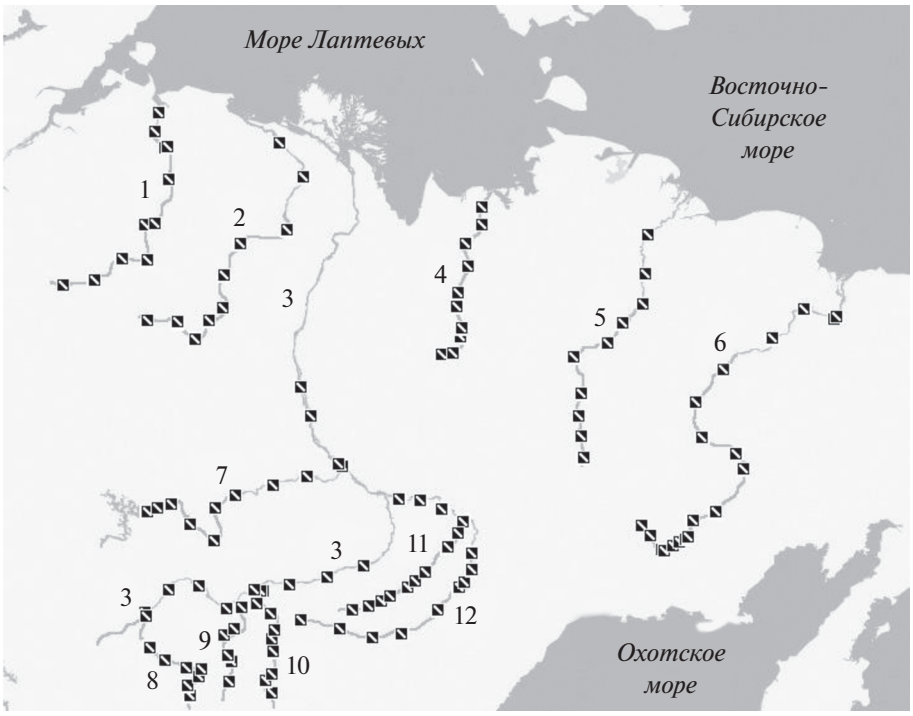


Рис. 1. Карта-схема района работ и пункты отбора проб. Исследованные реки: 1 – Анабар; 2 – Оленек; 3 – Лена; 4 – Яна; 5 – Индигирка; 6 – Колыма; 7 – Вилюй; 8 – Витим; 9 – Чара; 10 – Олекма; 11 – Амга; 12 – Алдан.

шева, 2018). Для некоторых из этих показателей были построены прогнозные модели их изменений при сохранении современных климатических тенденций (Gabyshev, 2018).

Целью настоящего исследования является оценка возможной флористической и ценотической трансформации фитопланктона в условиях глобального изменения климата на примере крупных рек Восточной Сибири.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В основу исследования положены результаты альгологических наблюдений, выполненных на 12 крупных реках Восточной Сибири: Лена, Вилюй, Колыма, Алдан, Оленек, Витим, Индигирка, Амга, Олекма, Анабар, Яна и Чара (рис. 1). Собранный материал имеет широкий географический масштаб, район работ ограничен в меридиональном направлении в пределах 106°53′–160°58′ в.д., а по широте – от 56°13′ до 73°10′ с.ш. Отбор проб фитопланктона проводили в 2000–2011 гг. в летнюю межень (июнь-август) в период максимальной вегетации водорослей, из поверхностного горизонта воды (0–0.3 м) как в прибрежной зоне, так и по фарватеру. Сбор и обработка проб фитопланктона выполнены в соответствии с методами, принятыми в гидробиологии (Садчиков, 2003).

В качестве инструмента статистического прогнозирования нами выбран метод искусственной нейронной сети, выбор обусловлен главным достоинством нейронных сетей – способностью моделировать нелинейные зависимости (Haykin, 2009). При этом анализ прошедших событий и получение вероятностной модели будущего происходит на основе временных рядов данных. В прогнозную модель был включен показатель численности фитопланктона. Вторая количественная переменная анализируемого массива данных характеризует продолжительность безледного периода на исследованных реках. Массив содержит 303 наблюдения, по которым отсутствуют пропуски, недопустимые при статистической обработке данных. Сведения о продолжительности безледного периода получены из гидрологических справочников (Ресурсы..., 1972, 1966).

Процедуры статистического анализа выполняли в модуле Statistica Automated Neural Networks (SANN) программного пакета Statistica 10.

Для конвенциональных подходов при формировании временных рядов данных требуются материалы, отражающие продолжительный временной интервал, в частности, полученные путем долгосрочных мониторинговых наблюдений. Поскольку наши данные о фитопланктоне не являются мониторинговыми, для построения временного ряда данных использован предложенный нами ранее подход (Gabyshev, 2018), который не имеет подобных ограничений. В основе данного подхода лежит метод пространственно-временного заме-

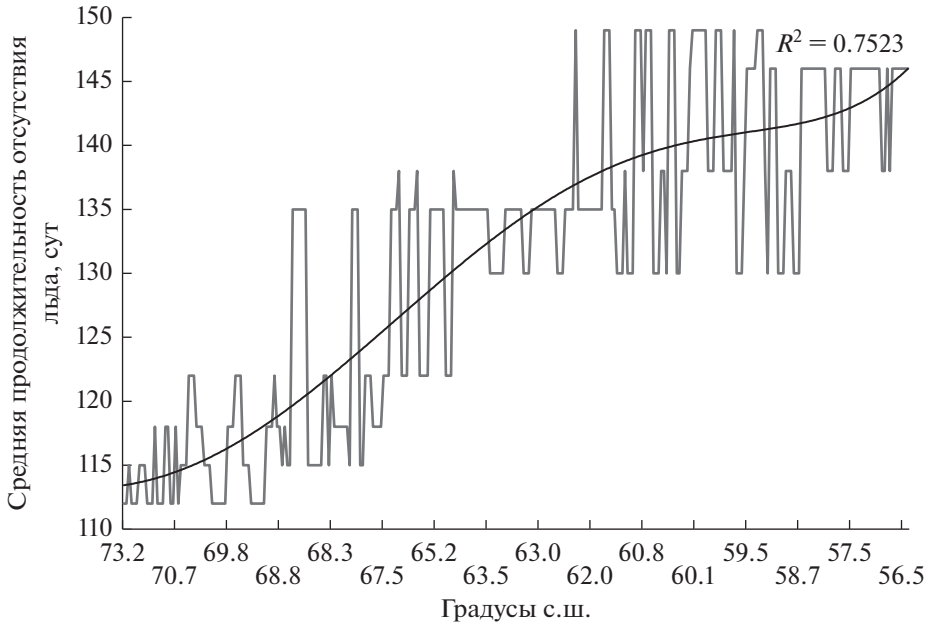


Рис. 2. Значения средней продолжительности безледного периода в пунктах отбора проб, сут. (ось ординат), ранжированные по убыванию географической широты, °с.ш. (ось абсцисс).

щения (Pickett, 1989). Исследователь, применяя данный метод, исходит из предположения, что пространственные и временные изменения эквивалентны. При изучении влияния климатических изменений на биоразнообразие, прогнозы, основанные на пространственно-временно́м замещении, показывают высокую эффективность (Blois *et al.*, 2013).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные о средней продолжительности безледного периода в каждом пункте отбора проб на исследованных нами реках, ранжированные по убыванию географической широты, а также результаты полиномиальной аппроксимации пятой степени и значение статистики R-квадрат (рис. 2) свидетельствуют, что период отсутствия льда увеличивается в направлении с севера на юг. Имеющиеся сведения о динамике продолжительности ледовых явлений в бассейнах рек Азиатской России за последние 35 лет, указывают на постепенный рост безледного периода (Vuglinsky, Valatin, 2018), а прогноз на ближайшие десятилетия подтверждает, что эта тенденция сохранится (Field *et al.*, 2014). Очевидно, что основной принцип метода пространственно-временного замещения, об эквивалентности пространственных и временных вариаций (Blois *et al.*, 2013; Pickett, 1989), соблюдается – безледный период на реках региона увеличивается как по “географической шкале” (с севера на юг), так и по “временной шкале”. Исходя из этого, при использовании наших данных для построения прогнозной модели, отсутствующую у нас “временну́ю шкалу” следует заместить переменной “географическая широта наблюдений”. Ранжировав показатели численности фитопланктона по уменьшению широты наблюдений, мы ввели их в анализ как временной ряд.

Для выявления внутренней цикличности данных временного ряда, был применен аналитический метод одномерного спектрального анализа Фурье. Результат анализа показывает, что внутри пула данных из 303 наблюдений есть периодичность, значение периода соответствует 100 единицам. Используя сведения о внутренней периодичности данных и применив регрессию временных рядов, мы обучили 50 нейро-сетевых моделей с условием случайного размера подвыборок в пределах 70% выборочной совокупности для обучающей подвыборки и по 15% для контрольной и тестовой. В анализе оставлено 5 наиболее удачных сетей, которые будут прогнозировать анализируемый ряд наблюдений (табл. 1).

По типу все сети представляют многослойный персептрон (МСП) со 100 входящими, 1 выходным и от 4 до 7 скрытыми нейронами. Кроме архитектуры нейро-сетевых моделей, в сводке представлены такие характеристики, как обучающий алгоритм (метод Бройдена–Флетчера–Гольдфарба–Шанно – БФГШ) и номер конечной итерации, на которой получена модель, а также метод активации скрытых и выходных нейронов. Сети ранжированы по величине их производительности, которая представляет собой величину корреляции между исходным рядом данных и

Таблица 1. Итоги нейросетевых моделей по показателю численности фитопланктона

№ п/п	Архитектура	Производительность обучения	Контрольная производительность	Алгоритм обучения	Функция активации скрытых нейронов	Функция активации выходных нейронов
4	МСП 100-7-1	0.79	0.78	БФГШ 5	Экспонента	Гиперболическая
3	МСП 100-6-1	0.70	0.68	БФГШ 5	Тождественная	Гиперболическая
2	МСП 100-7-1	0.69	0.72	БФГШ 5	Гиперболическая	Тождественная
5	МСП 100-4-1	0.67	0.68	БФГШ 4	Тождественная	Тождественная
1	МСП 100-7-1	0.67	0.67	БФГШ 3	Тождественная	Тождественная

предсказанным, чем ближе это значение к 1, тем лучше модель.

Для того чтобы узнать прогноз изменения переменной “численность фитопланктона” за пределами нашей выборки, построен график проекции временных рядов (рис. 3), где каждое следующее значение временного ряда строится по предыдущим значениям этого же временного ряда. Непрерывной серой кривой обозначен исходный ряд данных, другие кривые иллюстрируют предсказанные ряды для каждой нейросетевой модели. Как видно на графике проекций, все наиболее производительные модели предсказывают рост общей численности фитопланктона.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты нашего анализа показывают, что при современных тенденциях изменения климата, в качестве вероятного ответа высокоширотных сообществ фитопланктона, следует ожидать рост численности водорослей. На возможность роста уровня продукционных процессов в планктонных сообществах водоемов высоких широт, при увеличении вегетационного периода в рамках глобальных климатических изменений, исследователи указывали и ранее (George, 1991). Этот прогноз подтверждается данными о водоемах европейского севера, где история альгологических наблюдений насчитывает несколько десятилетий. Ряд авторов уже сейчас отмечают массовое развитие водорослей планктона водоемов Фенноскандии, и рост количественных показателей развития фитопланктона на порядок, объясняя это явление положительными температурными аномалиями последних десятилетий (Денисов, Кашулин, 2016). В водоемах Кольского полуострова, начиная с 2000 г., отмечаются ежегодные локальные явления массового развития цианобактерий, приводящие к “цветению”. Высокая вероятность нашего прогноза

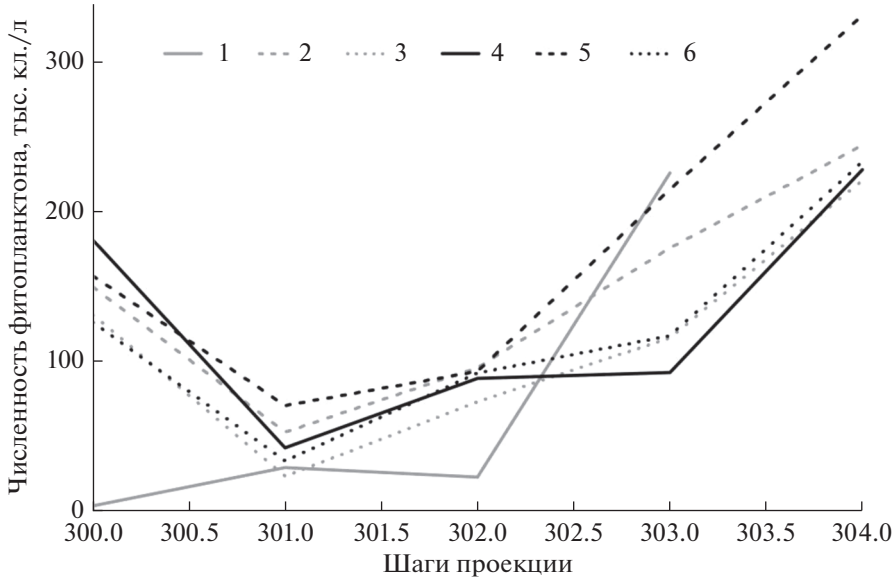


Рис. 3. Проекция временны́х рядов для переменной “численность фитопланктона”: 1 – Численность фитопланктона; 2 – [МСП 100-7-1]; 3 – [2. МСП 100-7-1]; 4 – [3. МСП 100-6-1]; 5 – [4. МСП 100-7-1]; 6 – [5. МСП 100-4-1].

подтверждается также данными диатомового анализа донных отложений водоемов Мурманской области (Кашулин и др., 2018). Максимальное, для исследованной колонки, значение численности диатомей в слоях, датируемых последними десятилетиями, исследователи связывают с современным потеплением в Арктике. Известно, что ответ пресноводных водорослевых сообществ на потепление по окончании малого ледникового периода, начиная с 1850 г., также выражался в резком увеличении их обилия и продукционного потенциала, о чем свидетельствуют результаты палеоклиматического диатомового анализа донных отложений водоемов Мурманской области и Норвегии (Кашулин и др., 2018).

При разработке и апробации нового подхода к прогнозированию, нами ранее были построены прогнозные модели (Gabyshev, 2018), согласно которым, возможным ответом высокоширотных сообществ фитопланктона на рост продолжительности безледного периода будет: 1) увеличение числа видов водорослей в пробе; 2) снижение среднего объема клеток фитопланктона; 3) рост флористических пропорций (отношения числа видов к числу семейств).

Известно, что в глобальном масштабе, с увеличением широты отмечается сокращение числа видов пресноводных местообитаний (Gaston, Blackburn, 2000). Это явление характерно и в пределах бореального региона и связывается некоторыми исследователями с реакцией различных таксономических групп на изменение температуры среды (Heino, 2001). Те же авторы указывают на вероятность увеличения количества пресноводных видов в бореальных регионах в связи с изменением климата, и объясняют это смещением видов теплых вод на север (Heino *et al.*, 2009). Основным фактором, способствующим расширению биогеографических границ южных видов в сторону высоких широт, считают увеличение температуры воды и, как следствие, рост продолжительности вегетационного периода (Корнева, 2007). Уже к настоящему времени к чужеродным видам, проникающим в новые экологические пространства, причисляют около пяти десятков видов планктонных водорослей, основное направление распространения которых – с юга на север (Корнева, 2014). Так, например, повышение температуры воды в Волге, начиная со второй половины XX в., где непрерывные мониторинговые наблюдения проводятся в течение ряда последних десятилетий, способствовало появлению и увеличению разнообразия “экзотических” видов диатомовых из рода *Thalassiosira* (Корнева, 2015). Поэтому наш прогноз на увеличение числа видов водорослей в пробе с ростом продолжительности безледного периода, вероятнее всего будет обусловлен распространением инвазийных видов планктона.

Гипотеза о том, что уменьшение размеров является универсальным экологическим ответом на глобальное потепление для водных экзотермных организмов, давно обсуждается (Atkinson, 1994) и находит ряд подтверждений (Daufresne *et al.*, 2009), несмотря на то, что некоторыми исследователями признается спорной ее универсальность (Rueger, Sommer, 2012). На примере диатомей арктических озер финской Лапландии было показано, что повышение температуры воды и сокращение периода ледовых явлений способствовало доминированию мелких видов планктона с быстрыми темпами роста (Sorvari *et al.*, 2002). Результаты диатомового анализа, выполненного для оз. Лугуху (Юньнань-Гуйчжоуское нагорье, Китай), показали тенденцию к уменьшению размеров клеток диатомей за последние шестьдесят лет и связь этого процесса с потеплением в регионе (Chen *et al.*, 2014). Ряд палеолимнологических исследований, выполненных на водоемах высоких широт и высокогорий, свидетельствуют о росте доли мелкоклеточных диатомовых водорослей в последние десятилетия (Sorvari *et al.*, 2002; Saros *et al.*, 2003; Rühland, Smol, 2005), что связывается с увеличением продолжительности безледного периода (Rühland *et al.*, 2008). Глобальные климатические изменения названы также причиной увеличения числа мелкоклеточных видов водорослей оз. Байкал, которое было выявлено при сравнительном анализе размерных характеристик планктонного сообщества пелагиали озера по наблюдениям 1990-х гг. и 2016 г. (Bondarenko *et al.*, 2019).

По мнению ряда авторов, для альгофлоры высоких широт характерна значительная доля семейств и родов, включающих по одному виду и низкие флористические пропорции в целом (Гецен и др., 1994; Науменко, 1994; Комулайнен и др., 2006). За счет высокой доли монотипных таксонов, в планктонных сообществах северных водоемов происходит смягчение межвидовой конкуренции в условиях борьбы за ресурсы в ограниченный вегетационный период. Результаты нашего анализа показывают, что с увеличением продолжительности безледного периода следует ожидать повышение флористических пропорций, т.е. сокращение числа монотипных таксонов и ослабление этой зональной специфики таксономического спектра альгофлоры рек субарктики.

* * *

Построенные нами прогнозные модели возможных трансформаций фитопланктона крупных рек Восточной Сибири в условиях глобальных климатических изменений свидетельствуют, что наиболее вероятным ответом высокоширотных сообществ планктонных водорослей будет снижение размерных показателей клеток фитопланктона, сокращение количества монотипных

таксонов, рост численности и риск возникновения "цветения" воды, а также увеличение числа видов за счет инвазий. Примененный нами прогнозный метод имеет свои ограничения, так как "временные ряды", вводимые в анализ, получены путем пространственно-временного замещения. Следовательно, мы определили имеющуюся тенденцию изменения анализируемых показателей речного фитопланктона, но пока не можем судить о временном масштабе прогноза. Водные экосистемы исследованных нами рек до сих пор сохраняют преимущественно неимпактный характер. Это позволило нам оценить влияние на фитопланктон климатических изменений, а не локальных антропогенных факторов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Госзадания ИБПК СО РАН по теме "Растительный покров криолитозоны таежной Якутии: биоразнообразие, средообразующие функции, охрана и рациональное использование" (0297-2021-0023; регистрационный номер АААА-А21-121012190038-0).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Габышев В.А., Габышева О.И. Фитопланктон крупных рек Якутии и сопредельных территорий Восточной Сибири. Новосибирск: Изд. АНС "СибАК", 2018. 416 с.

Гецен М.В., Стенина А.С., Патова Е.Н. Альгофлора Большеземельской тундры в условиях антропогенного воздействия. Екатеринбург: Наука, 1994. 145 с.

Денисов Д.Б., Кашулин Н.А. Цианопрокариоты в составе планктона оз. Имандра (К0ольский полуостров) // Тр. Кольского научного центра РАН. Прикладная экология Севера. Апатиты: Издательство КНЦ РАН, 2016. Вып. 4. № 7(41). С. 40–56.

Кашулин Н.А., Даувальтер В.А., Денисов Д.Б., Валькова С.А., Вандыш О.И., Терентьев П.М., Зубова Е.М., Королева И.М., Косова А.Л., Черепанов А.А. Комплексные исследования пресноводных экосистем Фенноскандии // Тр. Кольского научного центра РАН. Прикладная экология Севера. Апатиты: Издательство ФИЦ КНЦ РАН, 2018. Вып. 6. № 9(9). С. 34–86. https://doi.org/10.25702/KSC.2307-5252.2018.9.9.34-86

Комулайнен С.Ф., Чекрыжева Т.А., Вислянская И.Г. Альгофлора озер и рек Карелии. Таксономический состав и экология. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2006. 81 с.

Корнева Л.Г. Современные инвазии планктонных диатомовых водорослей в бассейне р. Волги и их причины // Биология внутренних вод. 2007. № 1. С. 30–39.

Корнева Л.Г. Инвазии чужеродных видов планктонных водорослей в пресных водах Голарктики (обзор) // Рос. журнал биол. инвазий. 2014. № 1. С. 9–37

Корнева Л.Г. Фитопланктон водохранилищ бассейна Волги. Кострома: Костромской печатный дом, 2015. 284 с.

Науменко Ю.В. Видовое разнообразие фитопланктона Оби // Сиб. экологический журнал. 1994. № 6. С. 575–580.

Ресурсы поверхностных вод СССР. Ленско-Индигирский район. Т. 17. Л.: Гидрометеоиздат., 1972. 651 с.

Ресурсы поверхностных вод СССР. Северо-Восток. Т. 19. Л.: Гидрометеоиздат, 1966. 602 с.

Садчиков А.П. Методы изучения пресноводного фитопланктона: методическое руководство. М.: Издательство "Университет и школа", 2003. 157 с.

Angeler D.G., Drakare S. Tracing alpha, beta, and gamma diversity responses to environmental change in boreal lakes // Oecologia. 2013. V. 172. I. 4. P. 1191–1202. https:// doi.org/0101 10.1007/s00442-012-2554-y.

Atkinson D. Temperature and organism size – a biological law for ectotherms // Adv. Ecol. Res. 1994. V. 25. P. 1–58. https://doi.org/10.1016/s0065-2504(08)60212-3

Bondarenko N.A., Ozersky T., Obolkina L.A., Tikhonova I.V., Sorokovikova E.G., Sakirko M.V., Potapov S.A., Blinov V.V., Zhdanov A.A., Belykh O.I. Recent changes in the spring microplankton of Lake Baikal, Russia // Limnologica. 2019. V. 75. P. 19–29. https://doi.org/10.1016/j.limno.2019.01.002

Blois J.L., Williams J.W., Fitzpatrick M.C., Jackson S.T., Ferrier S. Space can substitute for time in predicting climate-change effects on biodiversity // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. I. 23. P. 9374–9379. https://doi.org/10.1073/pnas.1220228110

Chen C., Zhao L., Zhu C., Wang J., Jiang J., Yang S. Response of diatom community in Lugu Lake (Yunnan–Guizhou Plateau, China) to climate change over the past century // J. Paleolimnology. 2014. V. 51. I. 3. P. 357–373. https://doi.org/10.1007/s10933-013-9760-4

Daufresne M., Lengfellner K., Sommer U. Global warming benefits the small in aquatic ecosystems // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. I. 31. P. 12788–12793. https://doi.org/10.1073/pnas.0902080106

Field, C.B., Barros, V.R., Dokken, D.J., Mach, K.J., Mastrandrea, M.D., Bilir, T.E., Chatterjee M., Ebi K.L., Estrada Y.O., Genova R.C., Girma B., Kissel E.S., Levy A.N., MacCracken S., Mastrandrea P.R., White, L.L. IPCC 2014: Summary for policymakers in Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge; New York: Cambridge University Press, 2014. P. 1–32.

Frey K.E., McClelland J.W. Impacts of permafrost degradation on arctic river biogeochemistry // Hydrological Processes. 2009. V. 23. I. 1. P. 169–182. https://doi.org/10.1002/hyp.7196

Gabyshev V.A. New approach to predicting change in aquatic ecosystems without having long-term monitoring data // Eur. J. Nat. History. 2018. № 3. P. 47–52. https://doi.org/10.4236/nr.2018.93006

Gaston K.J., Blackburn T.M. Patterns and Process in Macroecology. Oxford: Blackwell Science, 2000. 392 p. https://doi.org/10.1002/9780470999592.

George D.G. The influence of global warming on freshwater plankton communities in Britain // Freshwater Forum. 1991. V. 1. I. 3. P. 204–214.

Haykin S. Neural networks and learning machines. 3rd Edition. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2009. 906 p.

Heino J. Regional gradient analysis of freshwater biota: do similar biogeographic patterns exist among multiple taxonomic groups? // J. Biogeography. 2001. V. 28, I. 1. P. 69–76. https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2001.00538.x

Heino J., Virkkala R., Toivonen H. Climate change and freshwater biodiversity: detected patterns, future trends and adaptations in northern regions // Biol. Rev. 2009. V. 84. I. 1. P. 39–54. https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00060.x

Iatskiu P., Bovo-Scomparin V.M., Segovia B.T., Velho L.F.M., Lemke M.J., Rodrigues L.C. Variability in mean size of phytoplankton in two floodplain lakes of different climatic regions // Hydrobiologia. 2018. V. 823. I. 1. P. 135–151. https://doi.org/10.1007/s10750-018-3702-0

Magnuson J.J., Robertson D.M., Benson B.J., Wynne R.H., Livingstone D.M., Arai R.A., Barry R.G., Card V., Kuusisto E., Granin N.G., Prowse T.D., Stewart K.M., Vuglinski V.S. Historical trends in lake and river ice cover in the Northern Hemisphere // Science. 2000. V. 289. I. 5485. P. 1743–1746. https://doi.org/10.1126/science.289.5485.1743

Pickett S.T.A. Space-for-time substitution as an alternative to long-term studies // Long-Term Studies in Ecology. New York: Springer-Verlag, 1989. P. 110–135. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7358-6_5.

Rueger T., Sommer U. Warming does not always benefit the small – Results from a plankton experiment // Aquatic Botany. 2012. V. 97. I. 1. P. 64–68. https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2011.12.001

Rühland K., Smol J.P. Diatom shifts as evidence for recent Subarctic warming in a remote tundra lake, NWT, Canada // Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology. 2005. V. 226. I. 1–2. P. 1–16. https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2005.05.001

Rühland K., Paterson A.M., Smol J.P. Hemispheric-scale patterns of climate-related shifts in planktonic diatoms from North American and European lakes // Global Change Biology. 2008. V. 14. I. 11. P. 2740–2754. https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01670.x

Saros J.E., Interlandi S.J., Wolfe A.P., Engstrom D.R. Recent changes in the diatom community structure of lakes in the Beartooth Mountain Range, USA // Arctic, Antarctic, and Alpine Research. 2003. V. 35. I. 1. P. 18–23. https://doi.org/10.1657/1523-0430(2003)035[0018:rcitdc]2.0.co;2

Schiaffino R.M., Unrein F., Gasol J.M., Massana R., Balague V., Izaguirre I. Bacterial community structure in a latitudinal gradient of lakes: the roles of spatial versus environmental factors // Freshwater Biology. 2011. V. 56. I. 10. P. 1973–1991. https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2011.02628.x

Sorvari S., Korhola A., Thompson R. Lake diatom response to recent Arctic warming in Finnish Lapland // Global Change Biology. 2002. V. 8. I. 2. P. 171–181. https://doi.org/10.1046/j.1365-2486.2002.00463.x

Strayer L.S., Dudgeon D. Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges // J. North Amer. Benthol. Society. 2010. V. 29. I. 1. P. 344–358. https://doi.org/10.1899/08-171.1

Vuglinsky V., Valatin D. Changes in Ice Cover Duration and Maximum Ice Thickness for Rivers and Lakes in the Asian Part of Russia // Nat. Res. 2018. V. 9. P. 73–87. https://doi.org/10.4236/nr.2018.93006

Winder M., Sommer U. Phytoplankton response to a changing climate // Hydrobiologia. 2012. V. 698. I. 1. P. 5–16. https://doi.org/10.1007/s10750-012-1149-2

Assessment of Potential Phytoplankton Transformations of Large Rivers of Eastern Siberia in Response to Global Climate Change

V. A. Gabyshev[1, #]

[1]*Institute for Biological Problems of Cryolithozone SB RAS, Lenin str. 41, Yakutsk, 677980 Russia*

[#]*e-mail: v.a.gabyshev@yandex.ru*

Predictive modelling of large East Siberian rivers phytoplankton transformation in response to global climate changes was performed. Artificial neural networks and space-for-time substitution approach have been applied to our analysis. As a result, we determined that under the trend towards an increase of ice-free period on subarctic rivers, the likely response of planktonic algae communities will be: 1) an increase in the phytoplankton abundance and risk of "algal bloom", 2) an increase in the number of species due to invasions, 3) a decrease in phytoplankton cell size, 4) reduction in the number of monotypic taxa in the flora. The aquatic ecosystems of the rivers studied by us are still largely non-impact. This allowed us to evaluate the effect of climate change on phytoplankton, rather than local anthropogenic factors.

Keywords: phytoplankton, predictive model, global climate change, ice-free period, large rivers, East Siberia

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 6, с. 651–659

ЭКОЛОГИЯ

УДК 591.545:598.8

ЭКОЛОГИЯ СИБИРСКОЙ ПЕНОЧКИ-ТЕНЬКОВКИ *Phylloscopus collybita tristis* Blyth НА СЕВЕРНОМ ПРЕДЕЛЕ АРЕАЛА

© 2021 г. В. Н. Рыжановский@

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

@E-mail: ryzhanovskiy@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.10.2019 г.
После доработки 19.02.2020 г.
Принята к публикации 04.03.2020 г.

Сибирская пеночка-теньковка, будучи обитателем лиственных и хвойных лесов, в Западной Сибири расширила гнездовой ареал за счет тундровой зоны. Освоению Субарктики должны способствовать особенности экологии подвида, рассмотренные в настоящей работе.

Ключевые слова: Субартика, сибирская пеночка-теньковка, ареал, экология, фотопериод

DOI: 10.31857/S1026347021060159

В Российской Федерации гнездятся три подвида пеночки-теньковки: восточно-европейские (*Phylloscopus collybita abietinus)*, сибирские (*Ph. c. tristis*) и кавказские *Ph. c. caucasicus)* (Коблик и др., 2006). Восточно-европейские теньковки населяют Скандинавию и часть Восточной Европы, сибирские обитают не только в пределах всей Сибири, но проникают в Европу. Граница между восточно-европейским и сибирским подвидами проходит западнее Урала, примерно от п-ова Канин до г. Оренбург). На пространстве от этой границы до восточного склона Урала встречаются птицы с песней восточно-европейского типа, сибирского типа и гибридной песней (Коровин, 2004; Минеев, Минеев, 2012; Марова и др., 2014; Андреев, 2016).

Сибирская теньковка является выраженным лесным видом, населяющим лиственные и хвойные леса с кустарниковым и травяным ярусами (Рогачева, Сыроечковский (ред.) 2003). Относительно недавно, в середине прошлого века, считалось, что теньковка осваивает лесотундру (Птушенко, 1954; Данилов, 1966). В настоящее время северная часть ареала сибирской теньковки заходит не только в лесотундру, где пойменных лесов достаточно, но и в тундры, в частности, кустарниковые и мохово-лишайниковые (субарктические) тундры п-ова Ямал (Мониторинг .., 1997; Рябицев, Примак, 2006). Несомненно, сибирская теньковка расширяет ареал за счет Субарктики. Возможно, этому помогает текущее потепление климата, но освоение высокоширотных районов невозможно без соответствующих экологических адаптаций (Данилов, 1966).

Цель работы – описание экологии сибирской теньковки в Приобской лесотундре и на п-ове Ямал на основе собственных исследований и публикаций коллег для обсуждения адаптаций, способствующих проникновению этой пеночки в Субарктику.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Статья основана на результатах полевых наблюдений автора и коллег по Институту экологии растений и животных УрО РАН на Полярном Урале, в Нижнем Приобье и на п-ове Ямал; на материалах, полученных при обработке птиц, пойманных паутинными сетями и ловушками, на результатах экспериментальных исследований, проведенных в окрестностях г. Лабытнанги (полевые стационары Харп и Октябрьский) в летнее время и в лаборатории Экологического стационара УрО РАН (г. Лабытнанги) и Института экологии растений и животных УрО РАН (г. Екатеринбург) в зимнее время. Полевыми наблюдениями охвачена территория от долины р. Собь (66°50′ с.ш., 66°30′ с.ш.) в среднем ее течении, окрестностей г. Лабытнанги (66°35′ с.ш., 66°40′ с.ш) Приобье до широты фактории Тамбей (71°28′ с.ш.) на Северном Ямале в период с 1971 по 1990 гг. (рис. 1).

Учеты птиц проводились методом картирования гнездящихся пар на пробных площадках от 380 га (стационар Харп) до 22 га (стационар Октябрьский) в Нижнем Приобье, от 20 до 160 га в разных районах п-ова Ямал. В период учетов отыскивали гнезда, фиксировали сроки яйцекладки, вылупления, вылета, размер кладки, судьбу кладки и т.д.

Отловы птиц проводили в среднем течении р. Собь в 1976–1978 гг., в долине Нижней Оби (стационар Октябрьский) в 1978–1990 гг. и 2002–

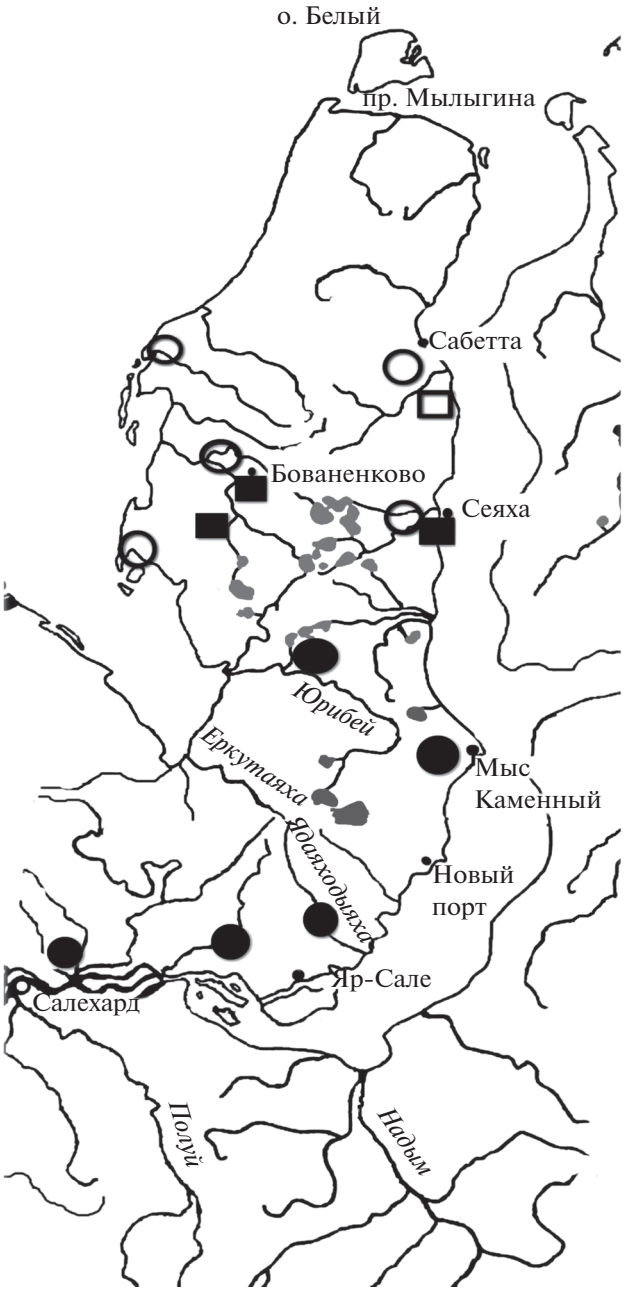


Рис. 1. Карта встречаемости/отсутствия гнездящихся пар теньковок на п-ове Ямал в 1974–1976 гг. – кружки, в 1988–2006 гг. – квадраты. Зачернено присутствие птиц в районе наблюдений.

2015 гг. Птиц отлавливали лучками на гнездах, паутинными сетями в кустах и по берегам водоемов, в 1979–1988 гг. на берегу протока Выл-Посл стояла ловушка “рыбачинского” типа, обращенная входом на юг весной, и на север во второй половине лета. Основные годы отлова теньковок 1977–1982 гг., не регулярно в июле–августе птиц ловили в последующие годы, вплоть до 2018 г. Прижизненная обработка отловленных птиц предусматривала регистрацию веса, упитанности, пола, возраста, длины крыла. Состояние оперения описывали по известной методике (Носков, Рымкевич, 1977).

Трех слетков выкормили и содержали с 10-суточного возраста до окончания линьки при короткодневном сокращающемся фотопериоде (16С : 8Т в середине июля с последующим сокращением дня на 30 мин каждые 5 сут до 12С : 12Т в начале сентября); 4 слетка жили при естественном фотопериоде широты Полярного круга (сокращающийся от 24С : 0Т в середине июля до 16С : 8Т в начале сентября). Вместе со слетками были взяты и содержались при естественном дне до окончания линьки две самки. Два взрослых самца были пойманы в августе и жили в вольере до сентября.

Для изучения предбрачной линьки 2 взрослых самца и 2 молодые птицы были пойманы в конце июля 2011г., перевезены на Средний Урал, где жили до следующего лета при фотопериоде, сокращающемся от 17С : 8Т в начале августа до 12С : 12Т в конце сентября, при 11С : 13Т – с начала октября до конца ноября, при 14С : 10Т – с начала декабря до конца марта с последующим ростом естественной продолжительности дня за окнами помещения до 18С : 6Т в конце мая. В сентябре 2015 г. на Среднем Урале были пойманы 27 первогодков теньковки сибирского подвида, 4 из них передержаны в клетках до следующего лета. В начале октября светлую часть суток сократили до 11 ч (11С : 13Т). При таком режиме, предполагаемом фотопериоде зимовки в Северной Индии и Пакистане (Птушенко, 1954), теньковки жили до 15 февраля, затем день увеличили до 12С : 12Т, при котором птицы жили до начала естественного увеличения дня за окнами помещения в марте, после весеннего равноденствия.

При обработке материалов применяли общепринятые методы статистики программы Statistika v. 6.0 (StatSoft Ink.,1984–2003). Различия считали достоверными при $P \leq 0.05$. Среднепопуляционные даты начала, окончания и длительность линек определяли, используя формат линейного тренда программы Microsoft® Excel 2002.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пространственное и биотопическое распространение. Распространение сибирской теньковки на Ямале (рис. 1) определяется наличием подходящих гнездовых стаций – зарослей ивняков и ерников. В районе пос. Бованенково в 1988–1990 гг. теньковки были весьма обычны (Мониторинг ..., 1997), а в 2006 г. они были обычны в кустарниках окрестностей пос. Сеяха, в самом поселке (Рябицев, Примак, 2006) и в кустарниках бассейна р. Мордыяха (Слодкевич и др., 2007). Но ранее, в 1974 и 1975 гг., теньковок мы не встречали ни на восточном побережье, в устье р. Сеяха и поселке,

ни в пойме междуречья Сеяха–Ясавейяха в 30 км от побережья, ни в верховьях р. Мордыяха, ни на западном побережье у мыса Моррасале. В 1974 и 1975 гг. теньковок не встречали в районе пос. Харасавэй и Тамбей, в 1988–1991 гг. эти пеночки не встречены в нижнем течении р. Венуйеуо, на границе субарктических и арктических тундр (Рябицев, 1993).

На широте пос. Мыс Каменный, в долине р. Нурмаяха и нижнем течении р. Юрибей теньковки были все годы (Данилов и др., 1984). В настоящее время южнее широты пос. Сеяха теньковки гнездятся по всей полосе тундр, от побережья Обской губы до берега Карского моря и Байдарацкой губы. Таким образом, за короткий период времени теньковки освоили северные субарктические (мохово-лишайниковые) тундры. На Южном Ямале, в Приобской лесотундре, на восточном склоне Полярного Урала теньковки встречены во всех точках, где работали мы или наши коллеги (Данилов и др., 1984; Головатин, 1999; Соколов, 2006; Головатин, Пасхальный, 2005, 2008).

В лесотундре теньковка является обитателем лесных участков. В тундровой зоне теньковки селятся в ивняковых зарослях, причем на севере субарктических тундр исключительно в поймах, а на юге тундровой зоны также и на водоразделах, по ручьям. На границе с лесотундрой они из тундр исчезают и встречаются только в пойменных лесах, на водоразделы выходят лишь отдельные пары (Головатин, Пасхальный, 2005).

Плотность гнездования. В лесотундре на широте г. Лабытнанги и на восточном склоне Полярного Урала теньковки малочисленны. В долине р. Собь в районе Красного камня плотность в 2002–2004 гг. составляла 3.0–3.2 пар/км^2. На территории стационара Харп площадью 380 га в 1971–1984 гг. теньковки не гнездились, несмотря на наличие ивняков, ерников и лиственничных редколесий. В лесу склона коренного берега и в пойме стационара Октябрьский на учетной площадке 22.5 га эти пеночки гнездились в течение 5 лет из 8 с максимальной плотностью 21 пар/км^2. В сезоны, когда теньковок не было на площадке, они гнездились за ее пределами. На учетных площадках в долине Хадытаяхи птицы гнездились также не регулярно. В пойменном лесу стационара Хадыта было максимально 15.4 пар/км^2, на стационаре Ласточкин берег было максимально 14.3 пар/км^2. Из 8 лет учетов теньковок регистрировали на последней площадке 5 лет (Рябицев, 1993).

Для кустарников поймы р. Юрибей Головатин и Пасхальный (2008) приводят следующие величины плотности: верховья 5.2 ± 1.4 пар/км^2, верхнее течение 9.0 ± 0.9 пар/км^2, среднее течение 3.9 ± 0.7 пар/км^2, нижнее течение 1.9 ± 0.8 пар/км^2. В тундрах плакора теньковки гнездились только в верховьях Юрибея 0.5 ± 0.2 пар/км^2 и верхнем течении 1.2 ± 0.2 пар/км^2. На западе Южного Ямала, в долине р. Еркутаяха, теньковки в 2003–2005 г. гнездились с плотностью 1–4 пар/км^2 (Соколов, 2006). Учетная площадка стационара Хановэй в нижнем течении р. Нурмаяха (Данилов и др., 1984; Рябицев, 1993) была значительна по размерам (160 га), за 12 лет учетов теньковки регистрировались на ней ежегодно с плотностью 1.2–9.4 пар/км^2. Таким образом, для всей подзоны кустарниковых (южных субарктических) тундр Ямала характерно гнездование теньковки с плотностью 1–10 пар/км^2. В северных субарктических (мохово-лишайниковых) тундрах в среднем течении Ясавэйяхи в 1975 г. на учетной площадке 50 га в пойме и 56 га на плакоре птиц не было, как не учтены они на маршрутах в 1975 г. на мысе Моррасале (Данилов и др., 1984). В окрестности пос. Бованенково в 1988–1990 гг. теньковки гнездились в ивняках плакора с плотностью 0.8–10.0, в среднем 5.1 пар/км^2 и в ивняках пойм с плотностью 5.7–13.8, в среднем 9.0 пар/км^2 (Мониторинг ... 1997).

Весенняя миграция. Прилет в лесотундру начинается 22.05.2003–15.06.1972, средняя дата 31.05 (n = 20). Наблюдается достоверный тренд смещения начала прилета на более ранние даты (рис. 2) в связи с более теплыми веснами последних лет (Рыжановский, Гилев, 2020). Среднесуточная температура воздуха в день регистрации первого самца –0.6–7.8, в среднем 3.6°C (n = 19). Самки прилетали на 3–7 дней позднее первых самцов. Интенсивность пролета низкая. В долине Оби только в 1978 г. за первые две декады с начала миграции линией сетей пойманы 28 теньковок, в другие годы там же ловили не более 15 птиц. Открытых пространств в период миграции избегают. В ловушку с низкой растительностью и поляной перед входом птицы не залетали. Из 19 птиц, пойманных весной, тощие и маложирные птицы были в меньшинстве – 8 особей, упитанность остальных определена как средняя и больше средней. Летом в сети попадались птицы с небольшими запасами жира и без него.

Гнездование. Для восточно-европейского подвида весьма обычны два цикла гнездования (Лапшин, 1990). Рябицев (2014) отмечает, что даже на севере лесной зоны Сибири самка сибирского подвида может загнездиться повторно после докармливания птенцов первого выводка. В Приобской лесотундре и тундрах Ямала случаи второго гнездования не наблюдали. Гнездо представляет собой шарик из сухой травы, обычно неправильной формы с боковым входом, лежащий на земле, на кустах, на жестких стеблях прошлогодней травы, на деревьях. Лоток всегда выстлан перьями, число которых в 3 гнездах было от 119 до 125 (Данилов и др., 1984). В лесотундре из 27 найденных гнезд 5 были на вершине или сбоку кочек, 1 на пеньке, 1 на земле, 10 гнезд на елях на высоте от 1

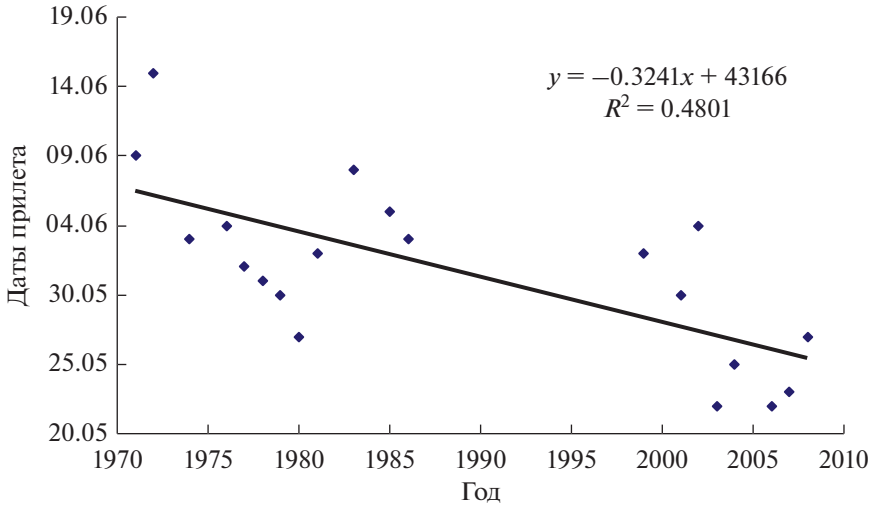


Рис. 2. Даты регистрации первых теньковок в окрестностях г. Лабытнанги, линия тренда и уравнение.

до 11 м, 10 гнезд были на кустах или на сухих стеблях травы. В тундрах Среднего Ямала на земле, чаще сбоку кочки или на склоне оврага найдены 22 гнезда, на кустах ив найдены 43 гнезда. В заболоченном пойменном ивняке большинство найденных гнезд располагались над водой и иногда затапливались после повышения уровня воды.

Гнездо строит самка, самец поблизости активно поет. От находки гнезда на стадии каркаса до завершения перьевой выстилки проходило 2–4 сут. В эти дни наблюдается частое спаривание пары. Первое яйцо откладывалось чаще в ночь после завершения строительства, но были самки, гнезда которых пустовали 2, 3 и даже 4 дня. Период от начала прилета до начала откладывания яиц в лесотундре в три разных сезона продолжался 18, 22, 26 сут. Появление первых яиц в гнездах в Нижнем Приобье и на Южном Ямале отмечали: 20.06.1971 г., 16.06.1973 г., 1.07.1978 г. (поздневесенний год), 24.06.1979 г., 19.06.1980 г., 26.06.1981 г., в среднем 22.06. На Среднем Ямале в период между 1983–1992 гг. наиболее ранняя дата начала сезона яйцекладки – 19.06.1990 г, наиболее поздняя 29.06.1987 и 1992 гг., средняя дата 25.06. Сезон яйцекладки, как правило, короткий. На Среднем Ямале в 1987–1990 гг. в контрольных гнездах (от 4 до 8) откладывание яиц продолжалось 8–12 сут, в 1991 и 1992 гг. в связи с, предположительно, повторными кладками, сезон продолжался 20 и 21 сут (13 и 10 контрольных гнезд).

В лесотундре в 23 гнездах с полными кладками было 5–9 яиц, в среднем 5.8 ± 0.2 яиц, на Среднем Ямале в 61 кладке было 3–6 яиц, в среднем 5.4 ± ± 0.08 яиц. Сокращение величины кладки в тундровой зоне не достоверно, кладка из 9 яиц, возможно, была сдвоенной, но три гнезда в лесотундре содержали по 7 яиц.

Насиживает самка, продолжительность инкубации от первого яйца до начала вылупления составляет 16–19, в среднем 17.6 сут, от последнего яйца до вылупления 12–13, в среднем 12.5 сут ($n = 8$). Самки насиживали в дневные часы после откладки 3-х и более яиц, При откладывании первого–второго яйца самки в гнезде только ночуют, т.к. гнезда с начатыми кладками мы находили только в ночные часы.

Вылупление в контрольных гнездах наблюдали преимущественно во второй декаде июля, в гнездах птенцы сидели 12–14, в среднем 13 сут ($n = 7$). Птенцов кормили чаще всего самки, самцы с кормом встречались редко. В лесотундре вылет слетков из гнезд регистрировали, преимущественно, в третьей декаде июля – 16.7–27.7, в среднем 21.7 ($n = 7$). На Среднем Ямале вылет наблюдали 21.7–27.7 ($n = 7$), в среднем 23.7. Там же было 2 гнезда с повторными кладками, птенцы из которых вылетели 4 и 13 августа.

Эффективность размножения. В Нижнем Приобье и на Южном Ямале из 111 контрольных яиц теньковки вылупилось 75 птенцов (67.6%), из 63 птенцов, бывших под наблюдением с момента вылупления, гнезда покинули 40 слетков (63.4%). Общая успешность размножения по 23 гнездам 45.4%. На Среднем Ямале из 269 контрольных яиц, вылупилось 190 птенцов (70.6%); из этих птенцов гнезда покинули 143 слетка (75.3%). Общая успешность размножения по 49 гнездам – 53.1%. В лесотундре основная причина гибели яиц и птенцов – серая ворона, сорока, ласка и горностай, в тундровой зоне – песец и горностай. В поймах в дожди гнезда размокали или тонули в поднявшейся воде.

Территориальный консерватизм и филопатрия. На территории стационара Октябрьский в весен-

не-летне-осенний период окольцовано 48 взрослых теньковок. На следующий год сетями поймано 3 самца (6.25%). Из 90 молодых теньковок, пойманных и окольцованных на участке в послегнездовое время, на следующий год вернулись 2 птицы (2.22%). На стационар Ласточкин берег вернулся один самец из 5 (20.0%), на стационар Хановэй вернулись 3 самца из 8 (37.5%) и 2 самки из 27 (7.4%) (Рябицев, 1993). Из окольцованы в гнездах 45 слетков, на следующий год в районе рождения никто не пойман.

Послегнездовые кочевки. На стационаре Октябрьский пойманы три окольцованные в гнезде теньковки через 21, 25 и 29 сут после вылупления. В послегнездовой период теньковки в пойме Оби были малочисленны, только в 1980 г. поймано 49 птиц, в другие годы – от 2 до 13. Интенсивность отловов возрастала в последней декаде августа в связи с началом миграции. Из 63 окольцованных в августе птиц повторно, через день, поймана одна особь (1.6%). Среди 36 птиц, помеченных в сентябре, повторно не поймано ни одной. Участок отлова нельзя считать непригодным для вида, ежегодно здесь гнездились 1–3 пары птиц. Видимо, низкий процент повторных отловов отражает особенности послегнездового периода этого вида.

Постювенальная линька. В природе теньковки заменяют кроющие туловища в обычном для воробьиных птиц объеме, т.е. перья, выросшие в гнезде. На крыле у некоторых птиц заменялись большие верхние кроющие второстепенных маховых, средние верхние кроющие второстепенных маховых, чаще внутренние, заменялись у большинства птиц, малые верхние кроющие второстепенных маховых – также у некоторых птиц. У большинства птиц заменялись верхние и нижние кроющие пропатагиальной складки, верхние и нижние кроющие кисти, средние нижние кроющие второстепенных маховых и нижние кроющие третьестепенных маховых (рис. 3).

Линька начинается рано, до полного отрастания рулевых и маховых перьев. Предшествует линьке дорастание юношеских перьев по периферии крупных птерилий. Начинается дорастание в возрасте 15–17 сут, продолжается до 30–35-суточного возраста. Три теньковки из не распавшегося выводка, пойманные повторно в возрасте 23 сут, имели дорастающие перья по всему телу, но линька не начиналась. В неволе при короткодневном фотопериоде (16С : 8Т) выкормлены 3 теньковки, при естественном дне – 4. Птицы первой группы начали линьку в 24–29, в среднем в 25.7 сут, птицы второй группы – в 24–25, в среднем в 24.2 сут. При коротком дне линька пеночек длилась 23–35, в среднем 27 сут, при естественном дне 36–40, в среднем 38 ± 0.9 сут. Несомненно, возраст начала линьки у этого вида контролируется эндогенно, но темпы ее зависят от внешних фотопериодических условий (Рыжановский, 2017).

Рис. 3. Полнота, возраст и сроки постювенальной (а), предбрачной (б) и послебрачной (в) линек в течение первого года жизни: *1* – линяет у всех осмотренных птиц, *2* – линяет у части или некоторых осмотренных птиц, *3* – не линяет; слева – верх тела, справа – низ тела.

Начинающие линьку теньковки отлавливались в первой декаде августа, с 2.08 по 12.08, но в раннем 1977 г. одна птица поймана 19 июля. Три

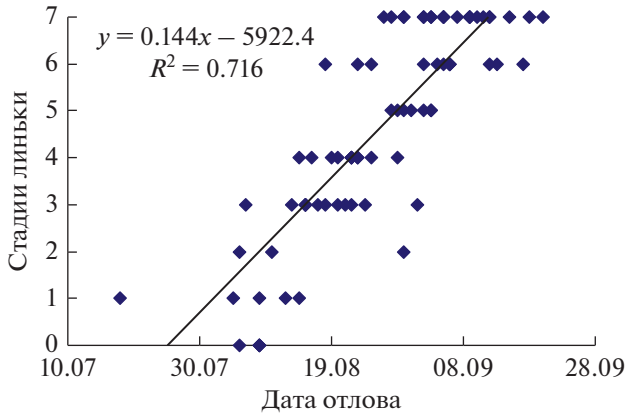


Рис. 4. Сроки отлова теньковок на разных этапах постювенальной линьки. Обозначения: ось ординат 0 – линька не началась, 7 – линька закончилась. Линия тренда соединяет средние даты начала и окончания линьки.

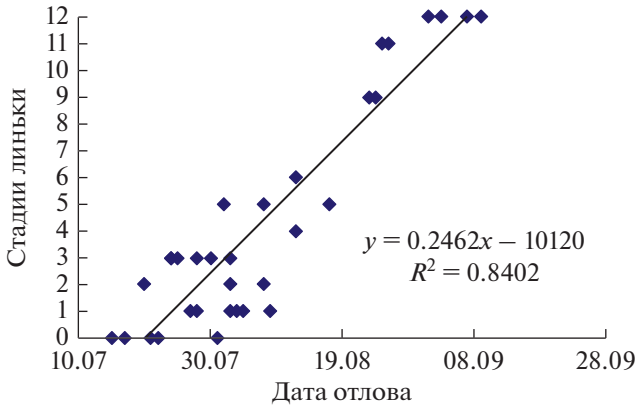


Рис. 5. Сроки отлова теньковок на разных этапах послебрачной линьки. Обозначения: ось ординат 0 – линька не началась, 12 – линька закончилась. Линия тренда соединяет средние даты начала и окончания линьки.

не начавшие линьку слетка пойманы 8 августа (рис. 4). При вылуплении птенцов в первой декаде июля, расчетный возраст начала линьки особи в природе был меньше 30 сут. Основной период линьки молодых северных теньковок – август. После 27.08 мы ловили птиц, закончивших линьку. По регрессии средняя многолетняя дата начала линьки – 31 июля, окончания – 11 сентября, средняя длительность – 42 сут. Самая поздняя дата отлова на стационаре Октябрьский заканчивающей линьку птицы – 18.09.1978 г. (фенологически поздний год), но основная масса птиц, заканчивающих линьку и в новом оперении, отлавливалась в первой половине сентября. Доля таких птиц среди теньковок, пойманных за вторую половину лета, значительна – 42.6%. Это дает основание считать, что молодые теньковки включаются в миграцию на последней стадии линьки или после ее окончания. Сезон линьки в 1977 г. длился 45–50 сут, в 1980 г – 35–40 сут.

Послебрачная линька. Для части теньковок Нижнего Приобья характерна неполная линька маховых (рис. 3). Из пары, взятой с выводком, самка не сменила второстепенные маховые, малые верхние кроющие второстепенных маховых и часть нижних кроющих крыла, самец сменил все перья. Но 6 теньковок, пойманные на завершающих этапах линьки, заменяли все маховые перья. С гнездованием линька теньковок если и совмещается, то незначительно. Все 4 взрослые птицы, пойманные у гнезда с 10–12-суточными птенцами, были в старом наряде. В дальнейшем один самец был случайно выпущен, линька второго началась по достижении птенцами 19-суточного возраста, линька самок началась через 27 и 29 сут после вылупления птенцов.

Начинающих линьку взрослых пеночек отлавливали в период с 20.7 по 7.08, в старом наряде птицы попадали в сети до 31 июля (рис. 5), средняя дата начала линьки – 27.07. Среди птиц, первыми вступившими в линьку, преобладали самцы, среди поздно ее начавших – самки. Период вступления в линьку продолжается 25–30 сут. Две теньковки, заканчивающие смену наряда (на 11-й стадии), пойманы 19.08 и 20.08. Средняя дата окончания линьки – 27.08, средняя длительность линьки 32 сут, длительность сезона линьки – 50–60 сут. В вольере при естественном дне вместе с выводком содержали самца. Линьку он начал 4 августа и закончил через 39 сут, 11 сентября.

Предбрачная линька у теньковок из Нижнего Приобья в клетках началась в последней пятидневке декабря, через 3 недели после перевода с фотопериода 11С:13Т на 14С:10Т и закончилась в первых числах февраля. Птицы, пойманные на Среднем Урале, начали линьку в первых числах марта, через 2 недели после увеличения светлой фазы с 11С до 12С. Полнота линьки теньковок из Приобья и пойманных на Урале существенно не отличалась. У всех передержанных птиц заменились контурное оперение головы и туловища. У двух северных первогодков заменились 17, 18, 19-е маховые и центральные рулевые, у 2 птиц, пойманных на Среднем Урале, заменились 18-е маховые и центральные рулевые. У остальных птиц перелиняли только голова и туловище (рис. 3). Продолжалась линька 30–35 сут, до конца марта.

Осенняя миграция. Теньковки мигрируют ночью (Большаков, 1975). Наблюдения за клеточными птицами показали, что с начала сентября, находясь в возрасте старше 50 сут две пеночки ночью периодически, сидя на жердочке, трясли крыльями, 7 сентября одна летала по большой вольере. Миграционное ожирение началось через 1–3 сут после окончания линьки, в возрасте 55–58 сут. В Нижнем Приобье последняя молодая

птица была поймана 11.09.1975 г., 6.09.1977 г., 21.9.1978 г., 9.09.1980 г.; взрослая – 10.09.1979 г. Общая продолжительность весенне-летне-осеннего сезона теньковок в лесотундре 112–118 сут, в северных субарктических тундрах менее 100 сут.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данилов (1966) выделял следующие направления адаптаций птиц к условиям Субарктики и Арктики: внутривидовую дифференциацию с формированием субарктических подвидов и популяций; способность к отложению жира в немиграционный период; повышение пороговых значений чувствительности к освещенности; повышение резистентности к низким температурам среды, сокращение длительности основных сезонных явлений: прилета, гнездования, линьки, отлета.

Северных подвидов теньковки нет. Ареал сибирской теньковки имеет большие, по сравнению с другими подвидами размеры. Теньковки номинативного подвида (*Ph. c. collybita*) населяют юго-запад Европы и в Субарктику не проникают, восточно-европейские теньковки (*Ph. c. abietinus*) населяют Восточную Европу и север Скандинавии с ее достаточно мягким климатом. Сибирские теньковки освоили не только лесотундру Сибири и Восточной Европы, но на Ямале и Гыданском полуострове глубоко проникают в тундровую зону (Рябицев, 2014). На пространстве Европейской части России восточно-европейские и сибирские теньковки обитают совместно, образуют пары. Территория, где регистрируют сибирских теньковок и потомство смешанных пар, самцов с гибридной песней, растет к западу. Мальчевский и Пукинский (1983) не приводят случаев встреч сибирской теньковки или регистрации гибридных песен для Ленинградской области и прилегающей территории. Но в настоящее время район регистрации сибирского подвида и гибридов включает Новгородскую область (Архипов, 2018) и Карелию (Хохлова, 2017). Возможно, одновременно восточно-европейская теньковка продвигается на восток, т.к. гибридные песни слышали на Среднем и Южном Урале при доминировании сибирской теньковки (Коровин, 2004; Торгашов, 2004; Марова и др., 2014).

Расширение ареала сибирской теньковки в Западной Сибири за счет тундр Ямала и Гыданского полуострова может свидетельствовать о формировании тундровой популяции сибирских теньковок, не требующих для гнездования биотопов с лесной растительностью. В северных субарктических тундрах кустарниковый ярус имеет высоту 0.8–1 м, на границе с арктическими тундрами 0.6–0.8 м (Мониторинг ..., 1997) при плотности пар, не меньшей чем в лесотундре и северной тайге. В умеренных широтах существуют значительные биотопические отличия между весничкой, также проникающей в северные субарктические тундры и теньковкой (Батова, Бурский, 2008), в тундрах отличий нет. Здесь птицы занимают общий биотоп – ивняки травяно-моховые пойм и водоразделов. Но если обитатель кустарников и куртинного подроста умеренных широт весничка незначительно изменила местообитания в тундрах, то теньковка почти радикально.

Небольшие запасы жира в гнездовое время, найденные у теньковок лесотундры, как у весничек и таловок (Рыжановский, 2004), можно рассматривать в качестве адаптации к нерегулярным летним возвратам холодов. Но полярный день, при необходимости, позволяет тундровым птицам кормиться круглосуточно, что они иногда делают. Возможно, летние запасы жира являются побочным следствием изобилия беспозвоночных в тундрах в середине лета (Ольшванг, 1992).

В лесотундре полярный день длится месяц, от занятия парами территорий до вылупления птенцов, в северных субарктических тундрах – три месяца. Почти весь период пребывания северных сибирских теньковок в тундрах не должен контролироваться фотопериодической реакцией, в отличие от теньковок умеренных широт, где наличествуют темная и светлая фазы суток. Минимальный возраст начала линьки у обоих европейских подвидов одинаковый: 32–35 сут, но максимальный возраст разный: 39–40 сут в Приладожье, 58–76 сут – в Германии, несмотря на более долгий день естественного фотопериода Приладожья, т.е. европейские подвиды отличаются реакцией на длину дня (Gwinner, 1969; Лапшин, 1990). Восточно-европейские теньковки при фотопериоде 70-й параллели (24С:0Т до конца июля) начнут линьку в первой половине августа, в возрасте не старше 40 сут. Западно-европейские теньковки *Ph. c. collybita* при фотопериоде 70-й параллели должны начать линьку в возрасте 60–70 сут, в конце августа, что слишком поздно, поэтому в Скандинавии гнездятся *Ph. c. abietinus,* более адаптированные к световому режиму приполярных широт.

Сведений об особенностях фотопериодического контроля годового цикла таежных сибирских теньковок у нас нет, адаптация лесотундровых и тундровых теньковок к световому режиму Субарктики, возможно, происходит в настоящее время. Весной прилетающие в лесотундру теньковки нуждаются в фотостимуляции гонад полярным днем, т.к. период от прилета до яйцекладки достаточно длинный (18–28, в среднем 22.0 сут; $n = 3$), однако не достоверно длиннее, чем у весничек (12–26, в среднем 20.9 ± 1.3; $n = 11$ сут), необходимость фотостимуляции которых выявлена в эксперименте (Рыжановский, 2001). Сроки начала постювенальной линьки теньковок определяются эндогенно, как продолжение роста-развития, что характерно для ряда северных видов и популяций и

адаптивно в летних условиях Субарктики (Рыжановский, 2007). Послебрачная линька теньковок начинается поздно, после распадения выводков (конец июля – начало августа), в отличие от настоящих субарктов (Рыжановский, 1997), совмещающих линьку с кормлением птенцов (иногда с насиживанием)и тем самым сдвигающих ее на более ранние даты, на середину июля. Темпы линьки северных теньковок высокие. Постювенальная и послебрачная линьки птиц из Нижнего Приобья округленно длилась при естественном дне 30–40 сут, в Приладожье 45–60 сут, в Западной Европе – 60–70 сут (Рыжановский, 2017). Но даже при высоких темпах линек северные теньковки отлетают из тундр и лесотундры последними из славковых, так как миграционное состояние формируется по окончанию линьки. На Среднем Ямале в районе пос. Бованенково в 1989 г. теньковки встречались на маршрутах до 6.09. (Шутов, личное сообщение), в лесотундре отлет заканчивается еще позднее.

Несомненно, теньковки холодоустойчивы. Даже восточно-европейские теньковки на Куршскую косу прилетают раньше других пеночек, улетают позднее, находясь в наиболее жестких, для пеночек, ранневесенних и позднеосенних погодных условиях (Паевский, 2018). В Приобскую лесотундру и тундровую зону сибирские теньковки прилетают и отлетают при температурах, близких 0°С. Безморозный период на Среднем Ямале длится 65–70 сут (Шиятов, Мазепа, 1995) при длительности весенне-летне-осеннего сезона теньковок 100–110 сут, т.е. часть годового цикла тундровых птиц протекает при низких положительных температурах. Даже через Средний Урал теньковки летят во второй половине сентября – начале октября, при температуре воздуха годы несколько выше 0°С, также последними из славковых.

* * *

На пространстве Западной Сибири сибирская теньковка за последние десятилетия расширила гнездовой ареал за счет северных субарктических тундр. При этом изменились требования к биотопу, вместо многоярусной растительности птицам достаточно низких разреженных ивняков. У этих пеночек нет второго цикла размножения, редки повторные кладки, весенне-лнтне-осенний сезон растянут в связи с особенностями фотопериодической реакции и холодостойкостью.

Работа выполнена при финансовой поддержке Президиума УрО РАН (проект 18-9-4-22).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Андреев А.А. Пеночки *Phylloscopus* в Архангельске и его пригородной зоне // Рус. орнитол. журн. 2016. Т. 25. № 1262. С. 939–947.

Архипов В.Ю. Первая регистрация сибирской теньковки *Phylloscopus collybita tristis* в Новгородской области // Рус. орнитол. журн., 2018. Т. 27. № 1702. С. 5869–5872.

Батова О.И., Бурский О.В. Гнездовые местообитания пеночек (Phylloscopus) в центральной Сибири // Бюл. Моск. о-ва испытателей природы. Отд. биологии. 2008. Т. 113. №. 3. С. 18–28.

Большаков К.В. Некоторые особенности звуковой сигнализации мигрирующих ночью птиц // Сообщения Прибалт. комиссии по изучению миграций птиц. Тарту. 1975. № 9. С. 137–149.

Головатин М.Г. Птицы бассейна реки Войкар // Матлы к распространению птиц на Урале, в Приуралье, и Западной Сибири. Екатеринбург: Изд-во Уральского ун-та, 1999. С. 75–81.

Головатин М.Г., Пасхальный С.П. Птицы Полярного Урала. Екатеринбург: Изд-во Уральского ун-та, 2005. 564 с.

Головатин. М.Г., Пасхальный С.П. Современное состояние орнитофауны долины р. Юрибей (Южный Ямал) и перспективы создания в бассейне реки природного парка. Научный вестник ЯНАО. Региональные аспекты исследований. Вып. 8(60) Салехард. 2008. С. 81–102.

Данилов Н.Н. Пути приспособлений наземных позвоночных животных к условиям существования в Субарктике. Т. 2. Птицы. Труды ин-та биологии УФАН СССР. Свердловск, 1966. 140 с.

Данилов Н.Н., Рыжановский В.Н., Рябицев В.К. Птицы Ямала. М.: Наука. 1984. 334 с.

Коблик Е.А., Редькин Я.А., Архипов В.А. Список птиц Российской Федерации. М.: КМК, 2006. 281 с.

Коровин В.А. О встречах восточно-европейской теньковки на Среднем Урале // Материалы к распространению птиц на Урале, в Приуралье и Западной Сибири. Екатеринбург: Изд-во Уральского ун-та, 2004. С. 105–106.

Лапшин Н.В. Пеночка-теньковка – *Phylloscopus collybita* (Vieill.) // Линька воробьиных птиц Северо-Запада СССР. Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1990. С. 28–33.

Мальчевский А.С., Пукинский Ю.Б. Птицы Ленинградской области и сопредельных территорий. Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1983. Т. 2. 504 с.

Марова И.М., Шипилина Д.А., Алексеев В.Н., Федоров В.В., Иваницкий В.В. Зона вторичного контакта восточно-европейской и сибирской теньковок (*Phylloscopus collybita abietinus – Ph. c. tristis*) на Южном Урале: свидетельство гибридизации // Труды Южно-Уральского гос. природ. заповедника. Уфа. 2014. С. 95–117.

Минеев Ю.Н., Минеев О.Ю. Птицы Большеземельской тундры и Югорского полуострова. СПб.: Наука, 2012. 383 с.

Мониторинг биоты полуострова Ямал в связи с развитием объектов добычи и транспорта газа / Под ред. Добринского Л.Н. Екатеринбург: Аэрокосмоэкология, 1997. 191 с.

Носков Г.А., Рымкевич Т.А. Методика изучения внутривидовой изменчивости линьки у птиц // Методика исследования продуктивности и структуры видов в

пределах их ареалов. Вильнюс: Изд-во Москлас, 1977. Ч. 1. С. 37–48.

Ольшванг В.Н. Структура и динамика населения насекомых Южного Ямала. Екатеринбург: Наука, 1992. 103 с.

Паевский В.А. Сравнительно-экологический анализ трех симпатричных видов пеночек – веснички *Phylloscopus trochilus,* теньковки *Ph collybita и* трещотки *Ph. sibilatrix //* Рус. орнитол. журн., 2018. Т. 27. № 1608. С. 2244–2253.

Птушенко Е.С. Род пеночка // Птицы Советского Союза. М.: Сов. Наука, 1954. Т. 6. С. 153–161. С. 2869–2872.

Рогачева Э.В., Сыроечковский Е.Е. (ред.). Атлас гнездящихся птиц Европы европейского совета по учетам птиц / Под ред. Рогачевой Э.В., Сыроечковского Е.Е. М.: ИПЭЭ РАН, 2003. 338 с.

Рыжановский В.Н. Экология послегнездового периода жизни воробьиных птиц Субарктики. Екатеринбург: Изд-во Уральского ун-та, 1997. 283 с.

Рыжановский В.Н Гнездовой сезон как часть годового цикла воробьиных Субарктики // Гнездовая жизнь птиц. Пермь, 2001. С. 3–22.

Рыжановский В.Н. Масса тела и жировые резервы воробьиных птиц Нижнего Приобья // Рус. орнитол. журн., 2004. Т. 13. № 271. С. 799–812.

Рыжановский В.Н. Роль фотопериодических условий высоких широт в дифференциации популяций воробьиных птиц // Рус. орнитол. журн., 2007. Т. 16. № 380. С. 307–314.

Рыжановский В.Н. Подвидовые особенности линьки пеночки-теньковки (*Phylloscopus collibita* L.) из Европы и Западной Сибири // Экология, 2017. № 3 С. 216–222.

Рыжановский В.Н., Гилев А.В. Об иерархии факторов, определяющих сроки начала прилета воробьеобразных птиц (Passeriformes) в Приобскую лесотундру // Зоологический журнал 2020. № 2. С. 1–16.

Рябицев В.К. Территориальные отношения и динамика сообществ птиц в Субарктике. Екатеринбург: Наука, 1993. 296 с.

Рябицев В.К. Птицы Урала, Приуралья и Западной Сибири. Екатеринбург: Изд-во Уральского ун-та, 2001. 605 с.

Рябицев В.К. Птицы Сибири. Москва; Екатеринбург: Кабинетный ученый. 2014. Т. 1. 438 с.

Рябицев В.К., Примак И.В. К фауне птиц Среднего Ямала // Материалы к распределению птиц на Урале, в Приуралье и Западной Сибири. Екатеринбург: Изд-во Уральского ун-та, 2006. С. 184–190.

Слодкевич В.Я., Пилипенко Д.В., Яковлев А.А. Материалы по орнитофауне долины реки Мордыяха // Мат-лы к распространению птиц на Урале, в Приуралье, и Западной Сибири. Екатеринбург: Изд-во Уральского ун-та, 2007. С. 221–233.

Соколов В.А. Население птиц на юго-западном Ямале и его динамика. Дис. канд. биол. наук. Екатеринбург: Ин-т экологии растений и животных УрО РАН. 2006. 170 с.

Торгашов О.А. К распространению восточно-европейского и сибирского подвидов теньковки в горнолесной зоне Южного Урала // Мат-лы к распространению птиц на Урале, в Приуралье и Западной Сибири. Екатеринбург: Изд-во Уральского ун-та, 2004. С. 182–183.

Хохлова, Т.Ю. Встреча гибридной теньковки *Phylloscopus collybita abietinus x Ph. c. tristis* в Себежском районе Карелии // Русский орнитол. журн., 2017.Т. 26. № 1519. С. 4552–4553.

Шиятов С.Г., Мазепа В.С. Климат / Природа Ямала. Екатеринбург: УИФ Наука. 1995. С. 37–51.

Gwinner E. Untersuchung zur Jahresperiodik von Laubsangern. Entwicklung der Gefieders, der Gewichter und der Zugunruhe bei Jungvogeln der Arten Phylloscopus: *Ph. trochilus, Ph. sibilatrix* und *Ph. collybita* // J. Ornithol. 1969. Bd. 110. № 1. S. 1–21.

Ecology of the Siberian Chiffchaff *Phylloscopus collybita tristis* Blyth at the Northern Limit of the Range

V. N. Ryzhanovskiy[#]

Institute of Plant and Animal Ecology UrB RAS, str. 8 March 202, Ekaterinburg, 620144 Russia

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

The Siberian Chiffchaff being an inhabitant of deciduous and coniferous forests, in Western Siberia expanded the breeding range due to the tundra zone. The development of the subarctic should contribute to the ecology of the subspecies, considered in this paper.

Keywords: Surarctic, siberian shiffchaft, habitat, ecology, photoperiod

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 6, с. 660–672

ЭКОЛОГИЯ

УДК 591.526:591.463.2.068.1.:593.32

АНАЛИЗ АДАПТАЦИОННЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ РЫЖЕЙ ПОЛЕВКИ *Myodes glareolus*, ОБИТАЮЩЕЙ НА ТЕРРИТОРИЯХ ПРИРОДНЫХ ГЕОХИМИЧЕСКИХ АНОМАЛИЙ

© 2021 г. В. П. Мамина*, @, Е. А. Малкова*

**Институт экологии растений и животных, Уральское отделение РАН, ул. 8 марта, 202, Екатеринбург, 620144 Россия*

@E-mail: mamina@ipae.uran.ru

Поступила в редакцию 09.08.2019 г.
После доработки 04.03.2020 г.
Принята к публикации 16.07.2020 г.

Проведен морфофункциональный анализ семенников и яичников у рыжей полевки (*Myodes glareolus* Shreb.), обитающей на территориях природных геохимических аномалий. На аномальных участках у животных при более низком уровне численности, по сравнению с фоновым участком, наблюдается усиление функциональной активности семенников и яичников, увеличение потенциальной и фактической плодовитости, снижение доимплантационных потерь. Адаптационные возможности репродуктивной системы самцов связаны с паракринными факторами, обеспечивающими поддержание сперматогенеза на оптимальном для оплодотворения уровне. У самок атрезия фолликулов, происходящая на ранних стадиях их развития позволяет сократить затраты энергии на их рост. Более энергоэкономный путь отбора и созревания фолликулов способствует увеличению числа овулирующих ооцитов и репродуктивного потенциала самок.

DOI: 10.31857/S1026347021050085

Проблема воздействия химических факторов среды на состояние организма и популяцию в целом до сих пор привлекает пристальное внимание исследователей. Это связано с тем, что избыток определенных химических элементов вызывает изменения в эндокринной, иммунной и репродуктивной системах (Авцын и др., 1991; Агаджанян, Скальный, 2001; Гашев, 2003). Данные о влиянии геохимического фактора естественной природы на репродуктивную систему мелких млекопитающих незначительны и фрагментарны. Районы, для которых характерно избыточное поступление ряда химических элементов в пищевую цепь, в основном из подстилающей горной породы относят к естественным положительным геохимическим аномалиям (Вернадский, 1980; Башкин, Касимов, 2004). Естественные геохимические аномалии (ЕГА) отличаются от антропогенных продолжительностью существования. Животные, обитающие на природных положительных геохимических аномалиях, в течение многих поколений подвергаются воздействию избыточного содержания определенных химических элементов. Данная проблема актуальна для Уральского региона, характеризующегося широким распространением естественных геохимических аномалий. Выживание популяции непосредственно связано с воспроизводством населения. В большинстве случаев в качестве показателя состояния репродуктивной функции мелких млекопитающих используется интенсивность размножения: величина помета, потенциальная и фактическая плодовитость, эмбриональные потери. Показатели, характеризующие репродуктивную функцию животных, по нарастанию эффектов располагаются следующим образом: величина помета – плодовитость – способность к зачатию – фолликулогенез – функциональный сперматогенез (Принципы сравнительной оценки ..., 1984). Изучение фолликулогенеза и сперматогенеза у мелких млекопитающих позволяет выявить адаптационные возможности репродуктивной системы животных к длительному воздействию комплекса тяжелых металлов (ТМ), и роль самок и самцов в формировании эмбриональных потерь. В природных популяциях наиболее часто наблюдается гибель эмбрионов до имплантации или в течение имплантации (от 10 до 30%), и значительно реже – после имплантации (0–2%) (Башенина, 1977; Артемьев, Окулова, 1981). Варьирование соотношения до и – постимплантационной гибели имеет различную природу: ранние летали могут возникать за счет снижения оплодотворяющей способности сперматозоидов и нарушения овариальной функции, поздние – результат мутагенного эффекта на сперматогенные клетки (доминантно-летальные мутации).

Следует отметить, что репродуктивная функция у рыжей полевки связана с плотностью популяции (Ивантер, 1975, 2005; Bujalska, 1975, 1983, 1990; Bujalska *et al.*, 1994). Механизм авторегуляции численности популяции обусловлен физиологическими факторами стресса, а именно гипофизо-адреналовым механизмом регуляции репродуктивной функции (Christian, Davis, 1964; Christian *et al.*, 1965; Christian, 1980, Роговин, Мошкин, 2007). Активизация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы при достижении порогового уровня плотности популяции может вызывать у животных угнетение репродуктивной системы и торможение скорости полового созревания (Науменко и др., 1983; Novikov, Moshkin, 1998; Novikov *et al.*, 2012). Степень проявления механизма авторегуляции численности зависит от условий обитания популяции и положения в ареале (Hansson, Henttonen, 1985; Ivanter, Osipova, 2000; Ивантер, 2005). У рыжей полевки в оптимуме ее видового ареала при высокой численности популяции, превышающей пороговые значения, включаются механизмы плотностно-зависимой регуляции (Жигальский, Бернштейн, 1986, 1989; Жигальский, 1994). В коренных южно-таежных темнохвойных лесах Среднего Урала (Висимский государственный природный биосферный заповедник, который может служить фоновой территорией в геохимическом отношении) у рыжей полевки установлен трехлетний популяционный цикл с чередованием трех фаз: депрессия, рост, пик (Жигальский, Кшнясев, 2000; Кшнясев, Давыдова, 2005). На данной территории при пике численности популяции у рыжей полевки наблюдаемая активация гипофиз-адреналовой системы сопровождается торможением полового созревания и угнетением репродуктивной функции (Кшнясев, Давыдова, 2005; Михеева и др., 2006; Жигальский, Мамина, 2015; Мамина, 2016).

Сравнительный анализ показателей, характеризующих репродуктивную систему рыжей полевки на геохимически аномальных участках и фоновой территории, отличающихся типом подстилающих горных пород, позволит выявить особенности размножения животных на данных участках.

Цель работы – провести анализ морфофункционального состояния яичников, семенников и сперматозоидов, оценить плодовитость и уровень эмбриональных потерь у рыжей полевки, обитающей на территориях геохимических аномалий для выявления адаптационных возможностей репродуктивной системы к длительному воздействию избыточного содержания кобальта, никеля и хрома.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на трех территориях, которые по схеме лесорастительного районирования Урала находятся в пределах южно-таежного округа Средне-Уральской горно-лесной области (Лесорастительные..., 1973). Основные породы древесной растительности – ель, пихта, сосна, береза, осина, а также неморальные реликты – липа и ильм. Основные кустарники – малина, шиповник, из ягод – черника, брусника и другие. На основании результатов оценки содержания химических элементов в почве выделены аномальные территории: участок в окрестностях п. Уралец (участок 1) и д. Анатольская (участок 2) Горнозаводского района Свердловской области. На аномальных участках основными подстилающими породами являются ультраосновные породы, которые характеризуются высокими концентрациями Ni, Co, Cr, максимальные концентрации которых превышают среднеуральские фоновые значения в 66.7, 20 и 20 раз соответственно. Исследования проводили на участках 1 и 2 (57°40′ с.ш. 59°40′ в.д.; 57°40′ с.ш. 60°07′ в.д. соответственно) с максимальной концентрацией ТМ (центр аномалии). (Михеева и др., 2003; Байтимирова, Михеева, 2005). Площадь участков 1 и 2 составляла 44 и 43 км^2 соответственно. Третий участок – Висимский государственный природный биосферный заповедник (57°21′ с.ш. 59°48′ в.д., площадью в 36 км^2), основными подстилающими породами которого являются габбро, диориты, гранитоиды, не содержащие в максимальных концентрациях химические элементы. Данный участок использовали в качестве фоновой территории. Изучение циклического характера динамики популяции рыжей полевки в Висимском государственном природном биосферном заповеднике проводится сотрудниками нашего Института с 1995 г. Полученные данные свидетельствуют о наличии трехлетнего популяционного цикла у рыжей полевки с чередованием трех фаз: депрессия, рост, пик. В период интенсивного летнего размножения отсутствие или незначительное число половозрелых сеголеток является характерной особенностью фазы "пик". Одним из маркеров фазы "пик" может быть и переход популяции на следующий год в фазу "депрессия" (Жигальский, Кшнясев, 2000; Кшнясев, Давыдова, 2005).

Объектом исследования служила европейская рыжая полевка (*Myodes glareolus* Schreber, 1780) – доминирующий вид среди грызунов. Отловы рыжей полевки проводили с помощью давилок с крючком и живоловок (на стандартную приманку) в период интенсивного размножения (с конца июня до середины августа); на фоновой территории – с 2001 по 2006 гг.; на аномальном участке 1 – с 2001 по 2004 гг.; на участке 2 – с 2004 по 2006 гг. Учеты относительной численности рыжей полев-

ки на каждом участке проводили на стандартных ловушко-линиях, состоящих из 50 давилок с расстоянием между ними 5 м. Определяли индекс уловистости по объединенному улову за 4 сут. Также на каждом участке устанавливали площадки живоловок 50–100 шт. с целью дополнительного отлова животных. Линия давилок и площадки живоловок на каждом участке были удалены друг от друга не менее чем на 200 м. По массе и размеру тела, степени развития тимуса, состоянию генеративной системы (у самок – влагалище, размер матки, наличие плацентарных пятен, эмбрионов, желтых тел, у самцов – масса семенников, их тургор, величина семенных пузырьков, наличие сперматозоидов) животных классифицировали на три функционально-возрастные группы: перезимовавшие особи, размножающиеся и не размножающиеся сеголетки. Возраст животных определяли по особенностям строения второго верхнего коренного зуба (Кошкина, 1955; Тупикова и др., 1970). Для гистологического анализа были использованы 110 самцов и 61 самка. Семенники животных фиксировали в 10%-ном формалине, парафиновые срезы семенника толщиной 5–7 мк окрашивали гематоксилином–эозином. Гистологические препараты семенников подвергались морфологическому и морфометрическому анализу. Индекс сперматогенеза рассчитывали по формуле: $Is = \sum a/N$, где a – количество слоев, выделенных в каждом канальце (1 слой – сперматогонии, 2 слой – сперматоциты, 3 – сперматиды, 4 – сперматозоиды); N – количество просчитанных канальцев (Ухов, Астраханцев, 1983). С помощью программного продукта Siams PHOTOLAB определяли диаметр семенных канальцев, размер ядер сперматозоидов и клеток эндокринного отдела семенника. От каждого самца на поперечном (срединном) срезе семенника подсчитывали число семенных канальцев с дегенерацией и без дегенерации в 50 семенных канальцах. Оценку морфофункционального состояния сперматозоидов проводили на эпидидимальных мазках, окрашенных азур–эозином. (Молнар, 1969). С помощью лабораторного счетчика просчитывают 200 сперматозоидов, учитывая живые (неокрашенные), мертвые (окрашенные) сперматозоиды и сперматозоиды с аномалией хвоста (Методические рекомендации ..., 1978).

Морфологический и морфометрический анализ яичников проведен на серийных срезах, изготовленных по стандартной методике (Волкова, Елецкий, 1982; Бессалова, 2006) с использованием программного продукта Siams Photolab. Фактическую (число плодов в матке) и потенциальную (число желтых тел в яичниках) плодовитость исследовали только у беременных самок (Тупикова, 1964). Для оценки интенсивности процесса фолликулогенеза в яичниках беременных самок рыжей полевки определяли количество и размеры

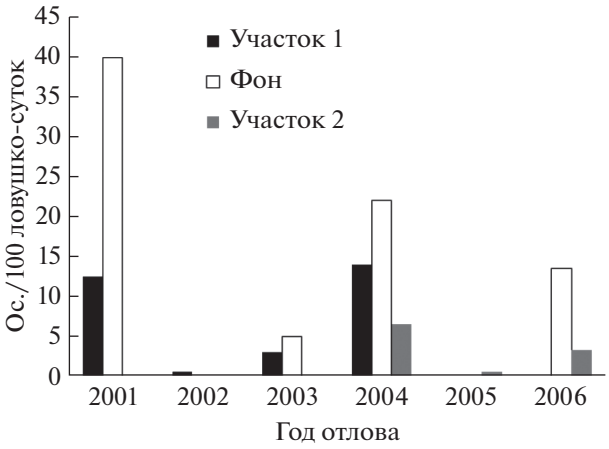


Рис. 1. Динамика численности рыжей полевки на изучаемых территориях.

однослойных, вторичных (компактные, полостные), третичных фолликулов. Проведена оценка частоты встречаемости атретических фолликулов и уровня эмбриональных потерь у беременных самок.

Для статистической обработки количественных данных использовали программное обеспечение Statistica 5.5. Гипотезу нормальности распределения значений в выборках проверяли с помощью теста Колмогорова–Смирнова, после чего применяли дисперсионный анализ, *t*-критерий Стьюдента или непараметрические критерий Краскела–Уоллиса, тест Манна–Уитни. В рамках дисперсионного анализа после изучения действия факторов на все группы, для дальнейших попарных сравнений использовали *post hoc* тест: LSD-тест.

Для анализа натуральных частот использовали критерий χ^2 (в таблице 2 × 2). Для статистических тестов был принят 5%-ный уровень значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Численность рыжей полевки на фоновой территории колеблется от сотых долей до 40 особей на 100 ловушко-суток, на аномальных участках – до 12.5 особей на 100 ловушко-суток (рис. 1). Относительное обилие рыжей полевки, обитающей на аномальном участке 1 (У1) ниже, чем на фоновой территории: в 2001 г. в 3.2 раза; в 2003 г – в 1.7 раза; в 2004 г – в 1.6 (рис. 1).

В отловах 2001 г. на исследуемых территориях сеголетки не размножались, в 2004 г. на фоновом участке половозрелые сеголетки составили 15%, на аномальном участке 1–9% (табл. 1).

Таким образом, на основании представленных данных 2001, 2004 гг. отнесены к фазе “пик”, 2002, 2005 гг. – к фазе “депрессия”, 2003, 2006 гг. – к фазе “рост”.

Таблица 1. Половозрастная структура популяции рыжей полевки в районах естественных геохимических аномалий (участок 1 и 2) и на фоновом участке

Год/район	Перезимовавшие, %		Сеголетки, %			
			неполовозрелые		половозрелые	
	самки	самцы	самки	самцы	самки	самцы
2004-участок 2	22	–	33	45	–	–
2006-участок 2	–	–	–	75	–	25
2001-участок 1	18	15	44	23	–	–
2003-участок 1	–	–	50	50	–	–
2004-участок 1	9	21	26	35	–	9
2001-фон	14	10	43	33	–	–
2003-фон	6	12	29	18	12	23
2004-фон	14	–	38	33	10	5
2006-фон	11	8	30	40	11	–

Таблица 2. Морфологические показатели семенников и сперматозоидов у рыжей полевки с фоновой и аномальных территорий ($M \pm m$; $p < 0/05$)

Признак	Фаза популяционного цикла					
	Рост			пик		
	фон $n = 35$	участок 1 $n = 17$	участок 2 $n = 15$	фон $n =24$	участок 1 $n = 17$	участок 2 $n = 15$
Диаметр семенных канальцев, мкм	176.4 ± 25.6	178.8 ± 18.2	175.6 ± 16.8	151.0 ± 23.4*	179.2 ± 23.8**	179.6 ± 25.3**
Число канальцев с дегенерацией сперматогенных клеток, %	5.1 ± 0.81	5.5 ± 0.9	5.1 ± 0.8	10.1 ± 1.3*	5.4 ± 0.8**	5.6 ± 0.6**
Индекс сперматогенеза	4.0 ± 0.4	3.85 ± 0.5	3.7 ± 0.6	2.75 ± 0.13*	3.85 ± 0.5**	3.9 ± 0.4**
Площадь ядер клеток Лейдига, мкм^2	35.2 ± 4.2	34.9 ± 2.8	36.1 ± 2.5	30.1 ± 3.1*	35.7 ± 4.3**	36.0 ± 3.8**
Площадь ядер клеток Сертоли, мкм^2	57.8 ± 4.8	58.1 ± 5.6	56.3 ± 6.0	51.8 ± 6.7*	57.0 ± 5.6**	57,3 ± 6.0**
Площадь ядер головок сперматозоидов, мкм^2	18.3 ± 2.7	17.4 ± 2.9	19.1 ± 2.8	13.8 ± 3.2*	17.2 ± 2.5**	18.0 ± 2.2**

Примечание. n – число животных; среднее арифметическое (M) ± ошибка среднего арифметического (m); * значимые различия на участке “фон” между фазами “рост” и “пик”; ** значимые различия между участком “фон” и аномальными участками 1, 2 на фазе “пик”.

Морфологический анализ семенников и сперматозоидов. По морфологическим показателям семенников и сперматозоидов половозрелые сеголетки не отличаются от перезимовавших особей, поэтому данные по этим параметрам были объединены. На диаметр семенных канальцев статистически значимо влияет фаза цикла ($F = 7.44$; $p < 0.001$), геохимические условия ($F = 11.23$; $p < 0.001$) и взаимодействие этих факторов ($F_{2, 11} = 10.65$; $p < 0.001$). При пике численности у животных с фоновой территории диаметр семенных канальцев значимо меньше, чем при росте численности ($p < 0.001$; LSD-тест), на аномальных территориях – значимо больше по сравнению с фоновым участком ($p < 0.001$; LSD-тест; табл. 2). На фоновом и аномальных участках при росте численности популяции практически у всех животных диаметр семенных канальцев соответствует активному сперматогенезу.

Число семенных канальцев с дегенерацией сперматогенных клеток статистически значимо выше у животных с фоновой территории при “пике”

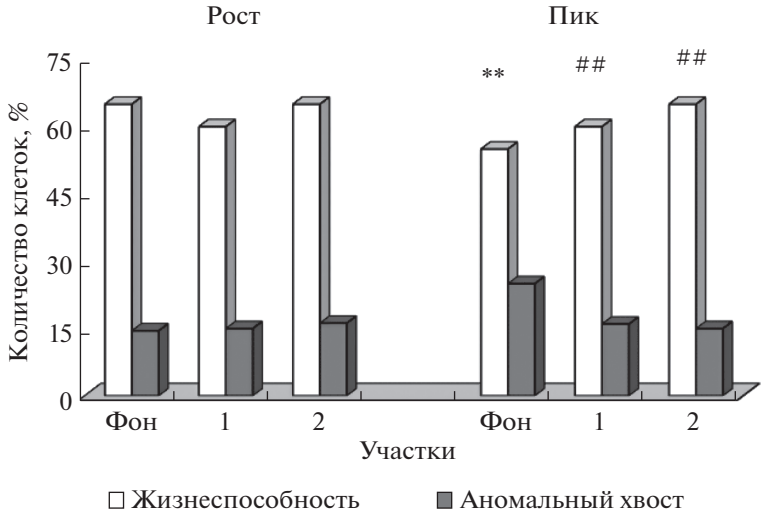


Рис. 2. Частота встречаемости жизнеспособных сперматозоидов и с аномалией хвоста у рыжей полевки с фонового и аномальных участков 1, 2 на фазе роста и пика численности популяции. * – значимые различия между фазами “рост” и “пик” на фоновой территории, # # – значимые различия между фоновым участком и аномальными участками 1, 2 на фазе “пик”.

численности по сравнению с фазой “рост” (χ^2 = = 16.35; $p < 0.001$), на аномальных участках 1 и 2 значимо ниже по сравнению с фоновым ($\chi^2 = 18.30$; $p < 0.001$; $\chi^2 = 15.70$; $p < 0.001$ соответственно (табл. 2).

На индекс сперматогенеза, отражающего активность сперматогенеза, статистически значимо влияет фаза цикла (F = 13.75; $p < 0.001$;), геохимические условия (F = 12.60; $p < 0.001$) и взаимодействие этих факторов (F = 28.50; $p < 0.001$). У животных с фонового участка на пике численности индекс сперматогенеза значимо ниже по сравнению с ростом численности ($p < 0.001$; LSD-тест), на аномальных участках 1, 2 значимо выше по сравнению с фоновым участком ($p < 0.001$; LSD-тест) (табл. 2).

Площадь ядер клеток Лейдига и Сертоли, статистически значимо меньше у животных с фоновой территории на пике численности по сравнению с ростом численности (H = 16.38; $n = 59$; $p < 0.001$; H = 20.66; $n = 59$; $p < 0.001$ соответственно). У животных с аномальных территорий при пике численности площадь ядер клеток Лейдига и Сертоли значимо больше по сравнению с фоновым участком (H = 23.84; $n = 56$; $p < 0.001$ и H = 22.89; $n = 56$; $p < 0.001$ соответственно (тест Краскела–Уоллиса) и не изменяется при росте численности популяции (H = 2.75; $n = 67$; $p = 0.2521$; H = 1.62; $n = 67$; p = = 0.445 соответственно (табл. 2).

На размер ядер головки сперматозоидов влияет фаза численности (F = 7.33; $p = 0.001$), геохимические условия (F = 12.7; $p = 0.001$) и их взаимодействие (F = 5.42; $p = 0.006$). Размер ядер головки сперматозоидов у животных с фоновой территории при пике численности статистически значимо меньше по сравнению с ростом численности ($p < 0.001$, LSD тест). Однако у животных с аномальных участков 1 и 2 при пике численности размер ядер головок сперматозоидов значимо выше, чем у особей с фоновой территории ($p < 0.001$, LSD тест (табл. 2).

Количество живых сперматозоидов у животных с фоновой территории при пике численности статистически значимо ниже по сравнению с ростом численности ($\chi^2 = 180.7$; $p < 0.001$). На аномальных участках 1 и 2 при пике численности количество живых сперматозоидов значимо выше по сравнению с фоновым участком ($\chi^2 = 34.75$; $p < 0.001$; χ^2 = = 76.06; $p < 0.001$ соответственно (рис. 2).

Число сперматозоидов с аномалией хвоста у животных с фоновой территории при пике численности статистически значимо выше по сравнению с ростом численности ($\chi^2 = 47.58$; $p < 0.001$). У животных, обитающих на аномальных участках 1 и 2, при пике численности количество сперматозоидов с патологией хвоста значимо ниже по сравнению с фоновым участком ($\chi^2 = 28.82$; p=0.001; $\chi^2 = 21.01$; $p < 0.001$ соответственно (рис. 2, 3). Сперматозоиды с аномальной головкой встречаются в единичных случаях (менее 1%).

Морфологический анализ яичников. По морфологическим показателям яичников половозрелые сеголетки не отличаются от перезимовавших особей, поэтому данные по этим параметрам были объединены.

На фоновом участке в фазе “рост” численности количество растущих фолликулов и размер компактных фолликулов больше (t-критерий Стьюдента = 11.28, df = 15, $p < 0.01$; $t = 2.61$, df = 76,

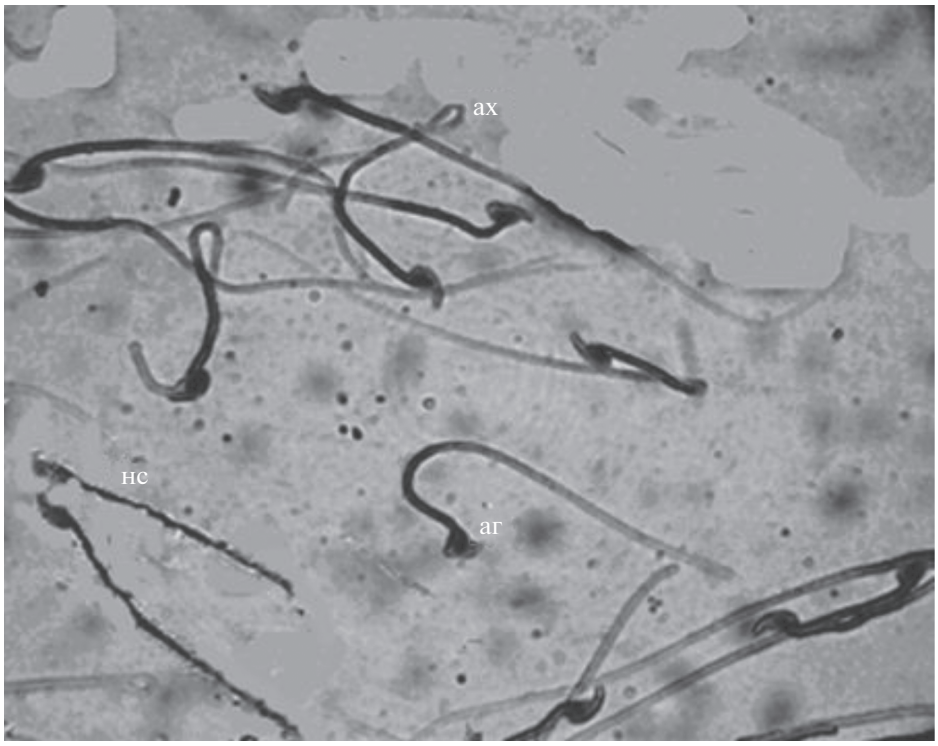


Рис. 3. Сперматозоиды рыжей полевки: нс – нормальный сперматозоид, аг – сперматозоид с аномальной головкой, ах – сперматозоид с аномальным хвостом (в виде петли).

$p = 0.01$ соответственно (рис. 4а, 4в) по сравнению с пиком, также увеличивается число вторичных ($t = 2.83$, df = 15, $p = 0.01$; (рис. 4б) и третичных ($t = 2.6$, df = 15, $p = 0.02$ (рис. 4г) фолликулов.

На аномальных участках 1 и 2 при пике численности число растущих фолликулов больше ($t = 4.33$, df = 16, $p < 0.01$; $t = 5.24$, df = 16, $p < 0.01$ соответственно (рис. 4а) по сравнению с фоновой территорией.

Количество вторичных фолликулов, подвергающихся атрезии, на пике численности выше у самок с участков 1 ($t = 2.26$, df = 16, $p = 0.04$) и 2 ($t = 3.36$, df = 12, $p = 0.01$ (рис. 5, 6) по сравнению с фоновой территорией. У животных с фонового участка при пике численности атрезия фолликулов преимущественно происходит на стадии третичных фолликулов, т.е. на поздних этапах их развития (рис. 5, 6).

Уровень потенциальной, фактической плодовитости и доимплантационной смертности у рыжей полевки на фоновом участке не зависит от фазы численности популяции и возраста животных (сеголетки, перезимовавшие), резорбция эмбрионов единична, поэтому для дальнейшего анализа данные по этим параметрам были объединены.

Значимых различий по потенциальной и фактической плодовитости, уровню доимплантационной смертности в зависимости от фазы численности и возраста (сеголетки, перезимовавшие) не обнаружено, поэтому данные были объединены. Фактическая плодовитость значимо выше на аномальных участках 1 и 2 ($U = 90.5$, $Z = 2.45$, $p < 0.05$; $U = 36.0$, $Z = 2.0$, $p < 0.05$ соответственно табл. 3), потенциальная плодовитость (число желтых тел беременности в яичниках беременных самок) – на участке 2 по сравнению с фоновой территорией ($U = 19.50$, $Z = -2.92$, $p < 0.05$).

Уровень доимплантационной гибели у самок на участках 1 и 2 ниже по сравнению с фоновой территорией, но различия статистически не значимы (табл. 3). Резорбция эмбрионов не обнаружена у животных с участка 1, а на участке 2 – единичные случаи.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучаемые районы естественных геохимических аномалий, как было представлено ранее, отнесены к природным биогеохимическим провинциям с избыточным содержанием кобальта, никеля и хрома, поэтому существование вида на данных территориях можно отнести к пессимальным условиям обитания. Ряд авторов отмечает, что в оптимальных условиях плотность населения вида не только выше, но и устойчивее, тогда как в пессимальных – она колеблется в большом диапазоне (Наумов, 1948; Майер, 1968; Европейская рыжая полевка ..., 1981). Подобное явление обна-

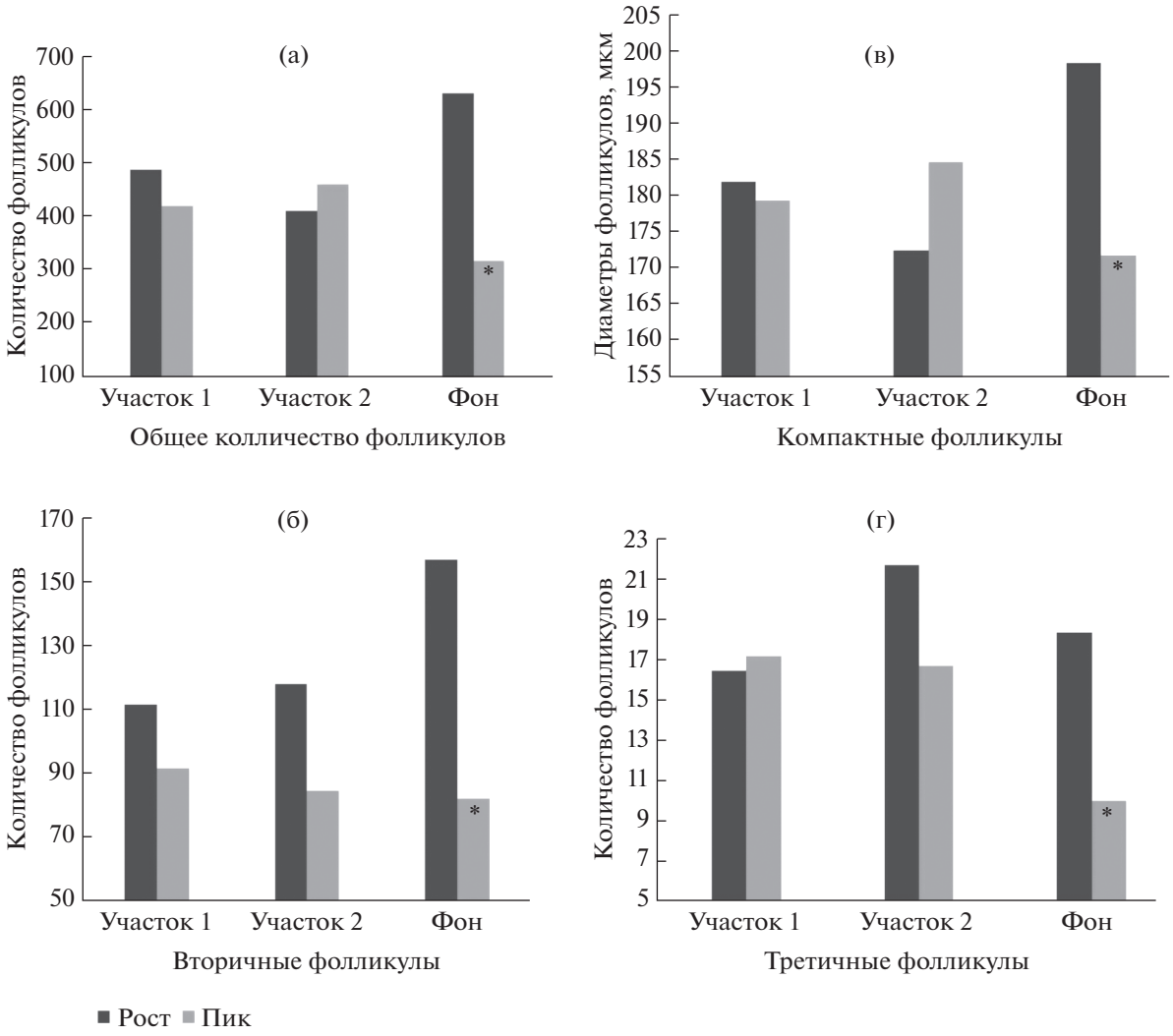


Рис. 4. Показатели интенсивности фолликулогенеза в яичнике рыжей полевки, обитающей в районах естественных геохимических аномалий (участок 1, 2) и на фоновом участке при разной численности популяции. (а) – * значимые различия на участке “фон” между фазами “рост”–“пик” ($t = 11.28$, df = 15, $p < 0.01$); *значимые различия между участками 1, 2 и фоновой территорией на фазе “пик” ($t = 4.33$, df = 16, $p < 0.01$; $t = 5.24$, df = 16, $p < 0.01$ соответственно); (б) – * значимое различие на участке “фон” между фазами “рост”–“пик” ($t = 2.83$, df = 15, $p = 0.01$); (в) – * значимое различие на участке “фон” между фазами “рост”–“пик” ($t = 2.61$, df = 76, $p = 0.01$); (г) – * значимое различие на участке “фон” между фазами “рост”–“пик” ($t = 2.6$, df = 15, $p = 0.02$).

ружено в популяции кустарниковой полевки, населяющей биогеохимическую молибденовую провинцию Анкавана (Сюзюмова, Карагезян, 1986). Результаты наших исследований показали, что, несмотря на низкий уровень относительной численности рыжей полевки на аномальных участках динамика многолетних колебаний численности популяций подобна динамике на фоновой территории. В литературе описаны случаи, когда циклика в популяциях сохраняется и при низком обилии населения, которого, вероятно, вполне достаточно для “включения” внутрипопуляционных механизмов, тормозящих размножение (Ивантер, 2005). В условиях Висимского заповедника пороговая плотность включения зависимых от плотности эффектов у рыжей полевки весной на фазе пика составляет 5–20 особей на 100 ловушко-суток (Кшнясев, Давыдова, 2005).

Снижение герминативной и эндокринной активности семенника у рыжей полевки на фоновой территории при пике численности обусловлено активацией гипофизарно-надпочечниковой системы, которая вызывает усиление продукции кортикостероидов (Михеева и др., 2006). На аномальных участках уровень плотности, вероятно, недостаточен для развития негативных эффектов адренокортикальной активности на репродуктивную систему по сравнению с фоновой территорией. Эффект адреналокортикальной активности на репродуктивную систему возможен лишь

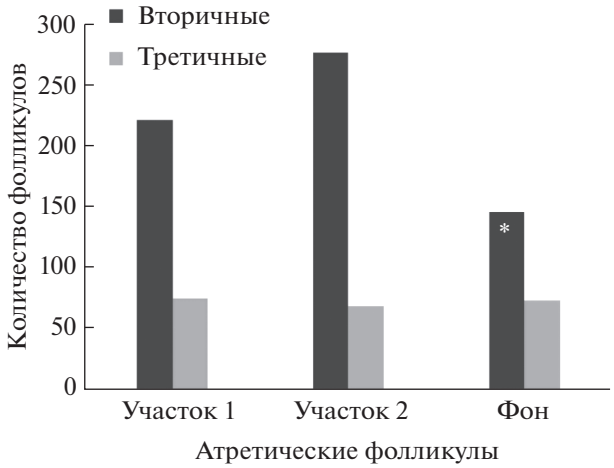


Рис. 5. Количество атретических фолликулов в яичнике рыжей полевки при высокой численности популяции ("пик"); * значимые различия между участком "фон" и участками 1, 2 (t = 2.26, df = 16, p = 0.04; t = = 3.36, df = 12, p = 0.01 соответственно).

при превышении стрессором порогового уровня воздействия (Роговин, Мошкин, 2007).

Существуют две петли регуляции секреции тестостерона (Connell, Connell, 1977). В рамках большой петли кортикостероиды ингибируют выработку гонадотропных гормонов и тем самым угнетают андрогенную функцию клеток Лейдига. В рамках короткой петли (внутрисеменниковой) угнетение синтеза тестостерона может происходить за счет эстрадиола β-17, вырабатываемого клетками Сертоли, когда происходит снижение ингибина и как следствие – возрастание фолликулостимулирующего гормона (ФСГ). Показано, что у сезонно размножающихся грызунов в период регрессии семенников происходит уменьшение объема цитоплазмы и размера ядер у клеток Лейдига и Сертоли, при активации сперматогенеза – повышение функциональной активности клеток эндокринного отдела семенника (Райцина, 1985; Шевлюк и др., 1999). Наблюдаемое нами увеличение дегенеративных процессов в сперматогенном эпителии обусловлено снижением активности эндокринного отдела семенника и увеличением ФСГ, который служит маркером дегенеративных изменений в половых клетках (Rich, de Kretser, 1977). К наиболее часто встречающимся нарушениям в сперматогенном эпителии относятся десквамация и дезорганизация сперматогенного пласта.

Дегенерация сперматогенных клеток не всегда приводит к их гибели, возможно образование аберрантных клеток, из которых впоследствии происходит формирование атипичных или не жизнеспособных сперматозоидов. Значимое снижение числа живых сперматозоидов и увеличение количества сперматозоидов с патологией хвоста (хвост в виде петли и двойной хвост), обеспечивающего подвижность клеток, у самцов на фоновой территории при пике численности приводит к снижению оплодотворяющей способности сперматозоидов. Уменьшение размера ядер головок сперматозоидов свидетельствует о пониженном содержании ДНК, которое отражается на фертильности животных (Bouters *et al.*, 1967; Sailer *et al.*, 1996).

Увеличение герминативной активности семенника у животных с аномальных участков при максимальной численности связано с усилением андрогенной активности семенника. Известно, что в регуляции пролиферации и дифференциации клеток сперматогенного эпителия главная роль принадлежит тестостерону, синтезируемого клетками Лейдига. Рецепторы тестостерона обнаружены на клетках сперматогенного эпителия – сперматогониях, сперматоцитах и ранних сперматидах, присоединение гормона к рецепторам усиливает ядерный обмен (Sun *et al.*, 1989, 1990; McLachlan *et al.*, 1994; O'Donnell *et al.*, 1994). Через ряд последовательных событий гормон осуществляет контроль биосинтеза белка и модулирует целый ряд внутриклеточных процессов, в том числе и клеточную пролиферацию. Следует отметить, что тестостерон регулирует функциональную активность клеток Сертоли, осуществляющих контроль над пролиферативной активностью сперм-

Таблица 3. Плодовитость и доимплантационная смертность у рыжей полевки с фоновой и аномальных территорий ($M \pm m$; $p < 0.05$)

Признак	Фон n = 19	Участок 1 n = 18	Участок 2 n = 8
Потенциальная плодовитость	5.4 ± 0.22	6.1 ± 0.24	6.9 ± 0.30*
Фактическая плодовитость	4.8 ± 0.23**	5.7 ± 0.22	6.1 ± 0.52
Доимплантационная смертность, %	9.20	5.12	3.78
Доля самок с доимплатанционными потерями, %	31.58	27.78	25.0

Примечание. n – число животных; среднее арифметическое (M) ± ошибка среднего арифметического (m); * значимые различия между участком "фон" и участком 2 (U = 19.50, Z = –2.92, $p < 0.05$); ** значимые различия между участком "фон" и участками 1 и 2 (U = 90.5, Z = 2.45, $p < 0.05$; U = 36.0, Z = 2.0, $p < 0.05$).

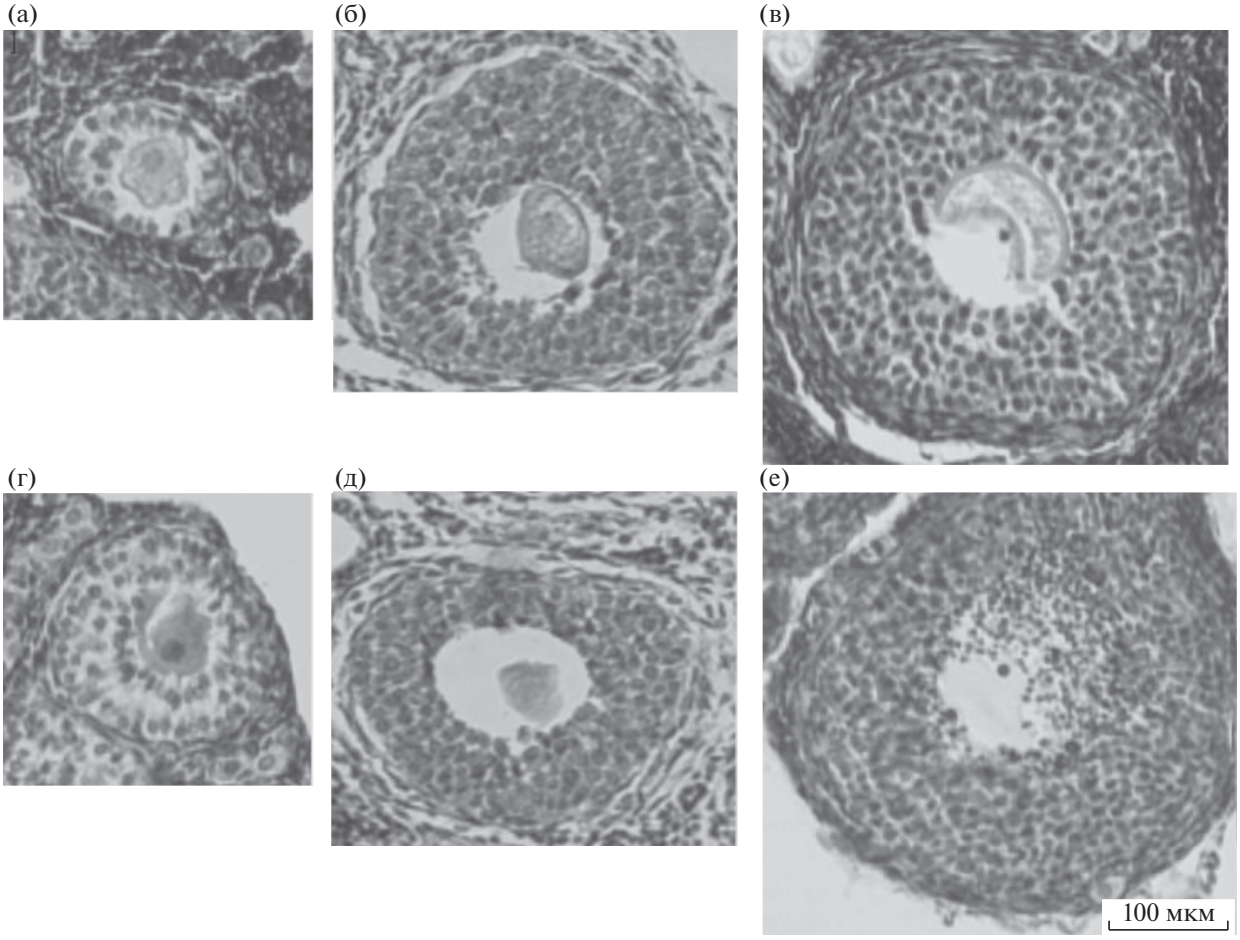


Рис. 6. Растущие фолликулы с признаками атрезии в яичнике рыжей полевки. Лизис ооцита: (а), (в). Сморщенная блестящая оболочка: (б), (г), (д). Гибель клеток фолликулярного эпителия с образованием фрагментов ядер: (е).

матогониальных клеток. Усиление функциональной активности клеток Сертоли способствует поддержанию высокого внутрисеменникового уровня тестостерона. Кроме того, возрастание уровня ингибина, вырабатываемого клетками Сертоли, и блокирующего выработку ФСГ, уменьшает дегенеративные процессы в сперматогенном эпителии, что отражается на морфологическом состоянии сперматозоидов.

Увеличение индекса сперматогенеза, интегрального показателя генеративной функции семенника, на аномальных участках при максимальной численности популяции обусловлено паракринными факторами (Huleihel, Lunenfeld, 2004; Walker, Cheng, 2005).

У самок на всех исследуемых территориях количество однослойных фолликулов не зависит от уровня численности. Это связано с тем, что рекрутирование примордиальных фолликулов в основном контролируется паракринной взаимосвязью между ооцитом, фолликулярным эпителием, соседними текальными и интерстициальными клетками. Они находятся в микросреде, исключающей контакт с большинством других клеток и кровеносными сосудами, имеют ограниченный доступ к эндокринной системе. Экспрессия рецепторов ФСГ отмечается в фолликулярном эпителии первичных фолликулов уже после инициации их роста (Петров и др., 2017). Отсутствие межгодовых изменений размеров полостных фолликулов объяснятся подавлением их развития во время беременности внутрияичниковыми факторами роста: эпидермального (ЭФР) и трансформирующего (ТФР-а) через снижения рецепторной чувствительности клеток гранулезы фолликулов к ФСГ. Кроме того, рост полостных фолликулов подавляется во время беременности ингибинами, которые синтезируются плацентой (Gougeon, 1996). Уменьшение числа фолликулов и размера компактных фолликулов у животных с фоновой территории при максимальной численности популяции обусловлено активацией гипофизарно-надпочечниковой системы, которая вызывает угнетение синтеза гонадотропинов (Christian *at al.*, 1963). Показано значение центральных механизмов в активации

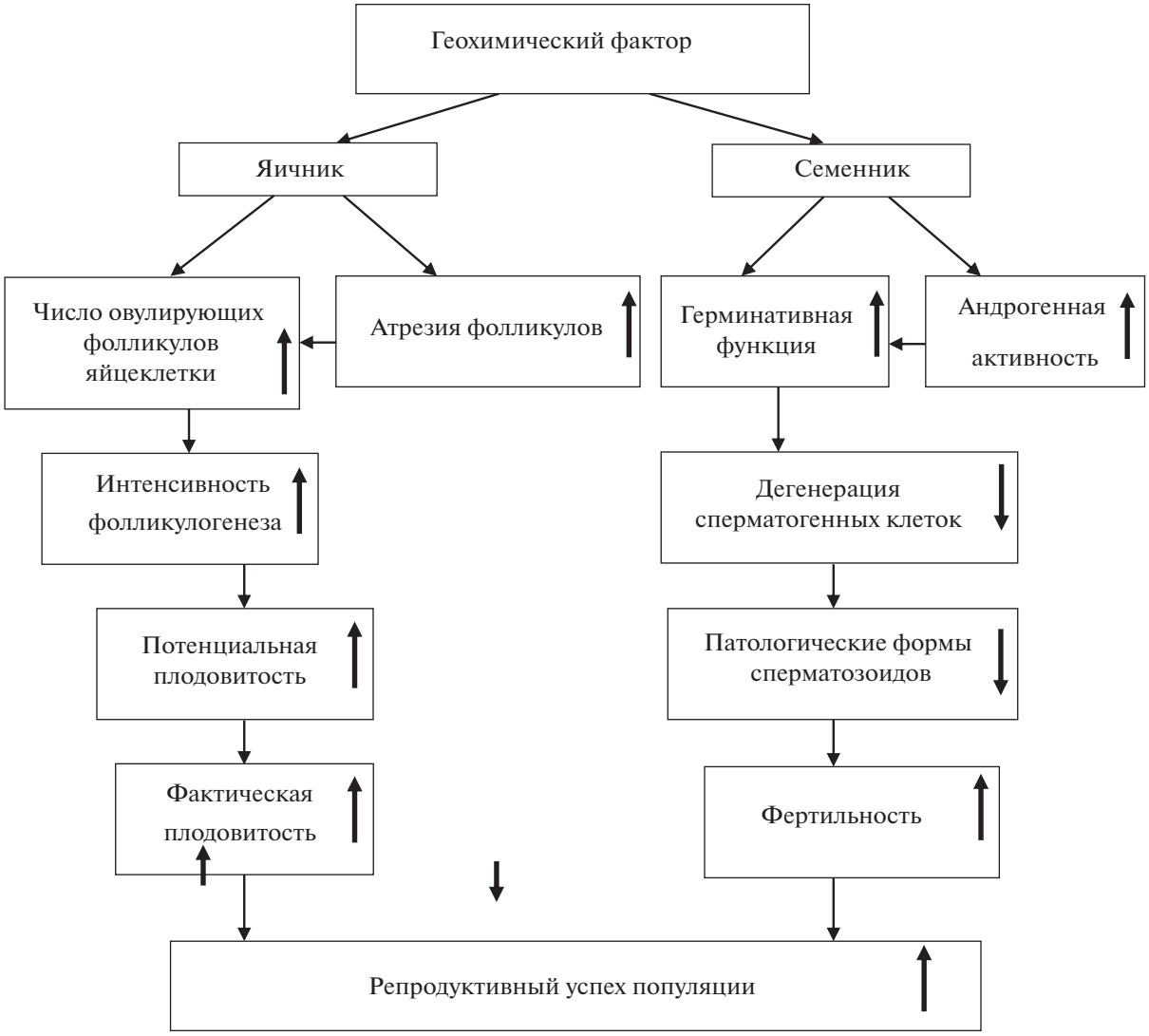


Рис. 7. Схема, отражающая состояние репродуктивной функции рыжей полевки, обитающей в условиях природной геохимической аномалии. Стрелка ↑ – усиление, ↓ – подавление.

гипофизарно-надпочечниковой системы. Усиление нейросекреции вазопрессина в портальный кровоток гипофиза полевок в условиях переуплотненной популяции оказывает стимулирующее влияние на адренокортикотропную функцию гипофиза и приводит к угнетению репродуктивной функции полевок (Владимирова и др., 2006).

Процесс отбора овариальных фолликулов, их рост, созревание и овуляция регулируются не только гонадотропинами и половыми стероидами, но и сложными внутриорганными механизмами. Известно, что во время каждого овариального цикла из примордиальных фолликулов формируется пул растущих фолликулов, большинство из которых подвергается атрезии на разных стадиях развития (McGee, Hsueh, 2000). По современным представлениям ключевой процесс, лежащий в основе атрезии незрелых фолликулов это постнатальный апоптоз ооцитов. Регуляция апоптоза в ооцитах подразделяется на 2 основные категории: процесс, происходящий при естественном развитии яичников, и процесс, происходящий в ответ на патофизиологическое повреждение (Tilly *et al.*, 2004). Митохондрии выполняют центральную роль в апоптозе, при этом наблюдается увеличение проницаемости митохондриальной мембраны. Баланс между про- и анти-апоптозных членов семейства Bcl-2 регулирует выход про-апоптозных веществ из митохондрий, ведущих к его запуску. Клеточный стресс (радиация, тяжелые металлы и др.) оказывает влияние на количество bcl-2 белков, определяя тем самым необходимость запуска апоптоза (Bröker *et al.*, 2005). При этом более ранний отбор растущих фолликулов, позволяет сократить за-

траты энергии, связанные с их дальнейшим ростом, повысить качество и число овулирующих ооцитов. Наблюдаемое нами увеличение потенциальной плодовитости на аномальных участках, вероятно, связано с отбором растущих фолликулов.

Одной из возможных причин повышения потенциальной и фактической плодовитости у самок рыжей полевки на естественной геохимической аномалии является интенсификация функциональной активности щитовидной железы (Михеева, 2006). Тиреотропный гормон (ТТГ) и трийодтиронин (Т3), имеющие в яичниках рецепторы, оказывают стимулирующее действие на функциональную активность гранулезных клеток, секрецию прогестерона и эстрадиола желтым телом; влияют на способность ооцитов к оплодотворению и жизнеспособность эмбрионов Wakim *et al.*, 1995; Oravec, Hlavacka, 2000).

Кроме того, согласно современным представлениям молекулярной биологии экспрессия *BMP 15*(*CDF9B*) гена важна для регуляции числа овулирующих ооцитов. У гетерозиготных животных по гену *BMP15* происходит увеличение количества овулирующих ооцитов (Pasquale *et al.*, 2004). Возможно, в популяциях рыжей полевки, обитающих на территориях природных геохимических аномалий, имеет место отбор гетерозиготных особей по данному признаку, обладающих повышенной плодовитостью.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что половозрелые самки и самцы, обитающие в условиях естественных геохимических аномалий при высокой численности способны поддерживать и высокую репродуктивную активность,

Таким образом, наблюдаемые нами особенности функционирования репродуктивной системы самцов и самок рыжей полевки, обитающих на территориях естественных геохимических аномалий, являются результатом действия целого комплекса внутриорганных механизмов, которые можно считать проявлением неспецифической адаптивной реакции, не сопровождающейся патологическими изменениями (рис. 7). На популяционном уровне это проявляется общим снижением относительного обилия и “сглаживанием” плотностно-зависимых механизмов. Отмечаемые флуктуации численности, совпадающие с динамикой циклической популяции на фоновом участке, характеризуются поддержанием постоянства репродуктивного потенциала размножающихся особей.

Подобная стратегия обеспечивает устойчивое функционирование популяций рыжей полевки, обитающей в условиях естественной геохимической аномалии с избыточным содержанием кобальта, никеля и хрома в течение многих поколений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С. Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология. М.: Медицина. 1991. 496 с.

Агаджанян Н.А., Скальный А.В. Химические элементы в среде обитания и экологический портрет человека. М.: Изд-во КМК. 2001. 83 с.

Артемьев Ю.Т., Окулова С.М. Методика полевого изучения эмбриональной смертности до имплантации у грызунов // Микроэволюция. 1981. С. 64–74.

Башенина Н.В. Пути адаптации мышевидных грызунов. М.: Наука. 1977. 353 с.

Башкин В.Н., Касимов Н.С. Биогеохимия. М.: Научный мир. 2004. 648 с.

Байтимирова Е.А., Михеева Е.В. Тяжелые металлы в печени животных, обитающих на территории естественной геохимической аномалии // Естествознание и гуманизм: сб. науч. работ. Томск, 2005. Т. 2. № 4. С. 36.

Бессалова Е.Ю. Оригинальная классификация фолликулов, адаптированная для экспериментального изучения яичников крупных млекопитающих // Сб. тр. Крым. гос. мед. ун-та им. С.И. Георгиевского. 2006. Т. 142. Ч. 1. С. 4–5.

Вернадский В.И. Проблемы биогеохимии. Тр. биогеохим. лаб. Ин-та геохимии и аналит. химии. М.: Наука. 1980. Т. 16. 226 с.

Владимирова Е.Г., Черниговская Е.В., Данилова О.А. Гипоталамо-гипофизарная нейросекреторная система красной полевки (*Cletrionomys rutilus*) в ходе популяционного цикла // Журн. Эвол. Биох. Физиол. 2006. Т. 32. Вып. 3. С. 308–317.

Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии. М.: Медицина. 1982. 304 с.

Гашев Ю.П. Загрязнение окружающей среды и экологическая обусловленность патологии человека. Аналит. обзор. НЦКиЭМ СО РАН. Сер. Экология. Новосибирск, 2003. Вып. 68. 137 с.

Европейская рыжая полевка / Отв.ред. Башенина Н.В. М.: Наука. 1981. 351 с.

Жигальский О.А., Бернштейн А.Д. Популяционные факторы регуляции размножения рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus* Schreb.) // Докл. АН СССР. 1986. Т. 291. № 1. С. 250–252.

Жигальский О.А., Бернштейн А.Д. Анализ факторов, определяющих численность и структуру населения рыжей полевки // Докл. АН СССР. 1989. Т. 305. № 6. С. 1509–1511.

Жигальский О.А. Зональные и биотопические особенности влияния эндо- и экзогенных факторов на население рыжей полевки (*Clethrionomus glareolus* Schreber, 1780). Экология. 1994. № 3. С. 50–60.

Жигальский О.А., Кшнясев И.А. Популяционные циклы европейской рыжей полевки в оптимуме ареала // Экология. 2000. № 5. С. 383–390.

Жигальский О.А., Мамина В.П. Плотностно-зависимые механизмы регуляции полового созревания самцов лесных полевок // Экология. 2015. № 6. С. 473–475.

Ивантер Э.В. Популяционная экология мелких млекопитающих таежного Северо-Запада СССР. Л.: Наука. 1975. 246 с.

Ивантер Э.В. Популяционные факторы динамики численности рыжей полевки (*Cletryonomys glareolus*) на северном пределе ареала // Тр. карельского науч. центра РАН. 2005. № 7. С. 48–63.

Кошкина Т.В. Метод определения возраста рыжих полевок и опыт его применения. Зоол. журн. 1955. Т. 39. Вып. 3. С. 631–639.

Кшнясев И.А., Давыдова Ю.А. Динамика плотности и структуры популяций лесных полевок в южной тайге. Вест. Нижегородского унив-та. Н. Новгород, 2005. Вып. 1. № 9. С. 113–123.

Лесорастительные условия и типы лесов Свердловской области Практ. руководство / Под ред. Колесникова Б.П. Свердловск: УНЦ АН СССР. 1973. 176 с.

Майер Э. Зоологический вид и эволюция. М.: Мир. 1968. 597 с.

Мамина В.П. Механизмы регуляции сперматогенеза у лесных полевок при разных фазах численности популяции Известия РАН. Сер. биологическая. 2016. № 3. С. 328–334.

Методические рекомендации “Методы экспериментального исследования по установлению порогов действия промышленных ядов на генеративную функцию с целью гигиенического нормирования” М., 1978.

Михеева Е.В., Жигальский О.А., Мамина В.П. Тяжелые металлы в системе почва – растение – животное в районе естественной геохимической аномалии // Экология. 2003. № 4. С. 318–320.

Михеева Е.В., Жигальский О.А., Мамина В.П., Байтимирова Е.А. Адаптация рыжей полевки к условиям природной биогеохимической провинции с избыточным содержанием никеля, кобальта и хрома // Журн. общ. биологии. 2006. Т. 67. № 3. С. 212–221.

Михеева Е.В. Морфофункциональные особенности надпочечника и щитовидной железы рыжей полевки на территории природной биогеохимической провинции: автореф. дис. канд. биол. наук Екатеринбург: ИЭРиЖ РАН, 2006. 26 с.

Молнар Е. Общая сперматология. Изд-во АН Венгрии. Будапешт. 1969. 294 с.

Науменко Е.В., Осадчук А.В., Серова Л.И., Шишкина Г.Т. Генетико-физиологические механизмы регуляции функций семенников. Изд-во “Наука” Сибирское отд. Новосибирск, 1983. 203 с.

Наумов Н.П. Очерки сравнительной экологии мышевидных грызунов М.: Л. Изд-во АН СССР, 1948. 203 с.

Петров И.А., Дмитриева М.Л., Тихоновская О.А., Петрова М.С., Логвинов С.И. Тканевые и молекулярные основы фолликулогенеза. Механизмы раннего фолликулярного роста // Проблемы репродукции. 2017. Т. 23. № 5. С. 33–41

Принципы сравнительной оценки радиационного и химического факторов / Под ред. Рамзаева П.В. М.: Энергоатомиздат. 1984. 232 с.

Райцина С.С. Сперматогенез и структурные основы его регуляции. М.: Наука, 1985. 206 с.

Роговин К.А., Мошкин М.П. Авторегуляция численности в популяциях млекопитающих и стресс (Штрихи к давно написанной картине) // Журн. общ. биологии. 2007. Т. 68. № 4. С. 244–267.

Сюзюмова Л.М., Карагезян А.Р. Особенности экологии кустарниковой полевки и лесной мыши в Анкаване // Техногенные элементы и животный организм. Свердловск, 1986. С. 14–22.

Тупикова Н.В. Изучение размножения и возрастного состава популяции мелких млекопитающих // Мет. изучения прир. очагов болезней человека. М.: Медицина, 1964. С. 154–192.

Тупикова Н.В., Сидорова Г.А., Коновалова Э.А. Опр. возраста лесных полевок. Материалы к познанию фауны и флоры СССР. 1970. Вып. 75, № 60. С. 160–167.

Ухов Ю.И., Астраханцев А.Ф. Морфометрические методы в оценке функционального состояния семенников. // Арх. анат. 1983. Т. 84. Вып. 3. С. 66–69.

Шевлюк Н.Н., Руди В.Н., Стадников А.А. Биология размножения наземных грызунов из семейства беличьих. Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 1999. 145 с.

Bouters R., Esnault C., Ortavant R., Salisbury G.W. Comparison of DNA revealed by Feulgen and by ultraviolet light in rabbit spermatozoa after storage in the male efferent ducts // Nature. 1967. V. 213. P. 181–182.

Bujalska G. Reproduction and mortality of bank voles and the changes in the size of an island population. Acta Theriol. 1975. V. 20. P. 41–56.

Bujalska G. Reproduction. Ecology of the Bank Vole // Acta Theriol. 1983. V. 28. P. 148–161.

Bujalska G. Social system of the bank vole, *Clethrionomys glareolus*. in: Social systems and population cycles in voles (Eds. R.H. Tamarin, R.S. Ostfeld, S.R. Pugh, G. Bujalska). Birkhauser Verlag: BaseL. 1990. P. 155–167.

Bujalska G., Gerlinskaya L., Grika L., Evsikov V., Moshkin M. Adrenocortical variability in life history of bank voles // Pol. Ecol. Studies. 1994. V. 7. P. 229–243.

Bröker L. E., Frank A.E. Kruyt and giuseppe giaccone. Cell death independent of caspases: a review // Clin. Can. Res. 2005. V. 11. Issue 9. P. 3155–3162.

Christian J.J., Mayer W., Gelder R. Endocrine adaptive mechanisms and the physiologic regulation of population growth // J. Physiol. Mammal. 1963. V. 1. P. 189–353.

Christian J.J., Davis D.E. Endocrines, behavior and population // Science. 1964. V. 146. P. 1550–1560.

Christian J.J., Lloyd J.A., Davis D.E. The role of endocrine in the self-regulation of mammalian populations in the self-regulation of mammalian populations // Rec. Progr. Hormone Res. N.Y.L. 1965. V. 21. P. 501.

Christian, J.J. Endocrine factors in population regulation, in biosocial mechanisms of population regulation. New Haven: Yale Univ. Press, 1980. P. 55–115.

Connell C.J., Connell G.M. The interstitial tissue of the testis // The testis / Eds Johnson A.D., Gomes W.R., Vandemark N.L. N.Y.: Acad. Press, 1977. V. 4. P. 333–361.

Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses // Endocrin Rev. 1996. № 17. P. 121–155.

Hansson L., Henttonen H. Regional differences in cyclicity and reproduction in *Clethrionomys* species: are they related? // Ann. Zool. Fenn. 1985. V. 22. № 3. P. 277–288.

Huleihel M., Lunenfeld E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors // Asian J. Androl. 2004. V. 6. P. 259–268.

Ivanter E.V., Osipova O.V. Population dynamics of the bank volt in the eastern part of its distribution range // Pol. J. Ecol. 2000. V. 48. P. 179–195.

McLachlan R.I., Wreford N.G., Meachem S.J., De Kretser D.M., Robertson D.M. Effects of testosterone on spermatogenic cell populations in the adult rat // Biol. Reprod. 1994. V. 51. P. 945–955.

McGee E., Hsueh A. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles // Endocrin Rev. 2000. № 21. P. 200–214.

Novikov E.A., Panov V.V., Moshkin M.P. Density-dependent regulation in populations of northern red-backed voles (*Myodes rutilus*) in optimal and suboptimal habitats of Southwest Siberia // Biol. Bull. Rev. 2012. V. 2. № 5. P. 431–438.

Novikov E., Moshkin M. Sexual maturation, adrenocortical function and population density of red-backed vole, *Clethrionomys rutilus* (Pall.) // Mammalia. 1998. V. 62. P. 529–540.

O'Donnell L., McLachlan R.I., Wreford N.G., Robertson D.M. Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle // Endocrinology. 1994. V. 135. P. 2608–2614.

Oravec S., Hlavacka S. Disorders of thyroid function and fertility disorders // Ceska Gynecol. 2000. V. 65. № 1. P. 53–57.

Pasquale E., Beck-Peccoz P., Persani L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (*BMP15*) gene // Amer. J. Hum. Gen. 2004. V. 75. № 1. P. 106–111.

Rich K.A., de Kretser D.M. Effect of differing degress of destruction of the rat seminiferous epithelium on levels of FSH and androgen binding protein // Endocrinology. 1977. V. 101. P. 959–974

Sailer B.L., Jost L.K., Evenson D.P. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility // Cytometry 1996. V. 24. P.167–173.

Sun Y.T., Irby, D.C., Robertson D.M., de Kretser D.M. The effects of exogenously administered testosterone on spermatogenesis in intact and hypophysectomised rats // Endocrinology. 1989. V. 125. P. 2141–2149.

Sun Y.T., Wreford N.G., Robertson D.M., de Kretser D.M. Quantitative cytological studies of spermatogenesis in intact and hypophysectomized rats: identification of androgen-dependent stages // Endocrinology. 1990. V. 127. P. 1215–1223.

Tilly J.L, Pru J.K, Rueda B.R. Role apoptosis in development, functioning and infringement of function ovary // The Ovary. 2004. V. 19. P. 321–345.

Wakim A.N., Polizotto S.L., Burholt D.R. Influense of thyroxine on human granulosa cell steroidogenesis *in vitro* // J. Assist. Reprod. Genet. 1995. V. 12. № 4. P. 274–277.

Walker W.H., Cheng J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells // Reproduction. 2005. V. 130. P. 15–28.

Analysis of the Adaptive Capabilities of the Reproductive System of the Bank Vole *Myodes glareolus*, Which Lives in the Territories of Natural Habitats Geochemical Anomales

V. P. Mamina[1, #] and E. A. Malkova[1]

[1]*Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Division of Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620144 Russia*

[#]*e-mail: mamina@ipae.uran.ru*

A morphofunctional analysis of the testes and ovaries of the bank vole (*Myodes glareolus* Shreb.), which lives in the territories of natural geochemical anomalies, was performed. At abnormal sites in animals with a lower population level, compared to the background site, there is an increase in the functional activity of the testes and ovaries, an increase in potential and actual fertility, a decrease in pre-implantation losses. The adaptive capabilities of the male reproductive system are associated with paracrine factors that ensure the maintenance of spermatogenesis at the optimal level for fertilization. In females, atresia of the follicles, which occurs in the early stages of their development, reduces the energy consumption for their growth. A more energy-efficient way of follicle selection and maturation contributes to an increase in the number of ovulating oocytes and the reproductive potential of females.