

# СОДЕРЖАНИЕ

Номер 6, 2022

## БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Экспериментальная трансплантация мезенхимных стромальных клеток как подход к исследованию их дифференцировки *in vivo* (Обзор)

О. В. Паюшина, Д. А. Цомартова, Е. В. Черешнева, М. Ю. Иванова, Т. А. Ломановская,  
М. С. Павлова, С. Л. Кузнецов

563

## ГЕНЕТИКА

Экспрессия матричных РНК транскрипционных факторов GATA3, FOXP3, TBX21, STAT3, NFKB1, MAPK8 у человека и их кооперативные взаимодействия в отдаленные сроки после хронического радиационного воздействия

В. С. Никифоров, А. В. Аклеев

575

## БОТАНИКА

Регенерационная способность клеточных линий лиственницы сибирской в культуре *in vitro*

И. Н. Третьякова, М. Э. Пак, Н. В. Орешкова, В. Е. Падутов

585

## ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Элиситорное действие дрожжевого экстракта на накопление фенольных соединений и антирадикальную активность клеток *Linum grandiflorum* в условиях *in vitro*

Е. А. Гончарук, О. Л. Сайбель, Г. П. Зайцев, Н. В. Загоскина

597

Идентификация генов альтернативной оксидазы митохондрий *Lupinus luteus* и влияние на их экспрессию салициловой кислоты

П. А. Буцанец, Н. А. Шугаева, А. Г. Шугаев

607

## ЗООЛОГИЯ

Морфологическая изменчивость степной пеструшки (*Lagurus lagurus* Pall) на северо-востоке ареала

Т. А. Дунал, С. А. Абрамов, Ю. Н. Литвинов

614

Морфо-генетические особенности колонка (*Mustela sibirica* Pall.) на северо-восточной окраине ареала (бассейн средней Лены, Якутия)

Е. С. Захаров, В. М. Сафронов, Н. Н. Захарова, Л. А. Пестрякова, Л. П. Корякина,  
S. Kruse, Н. А. Бочкарев

626

## ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Влияние хитозана на свертывание крови гепаринизированных крыс

Л. А. Ляпина, Т. Ю. Оберган, М. Е. Григорьева, Т. А. Шубина

636

Выявление матричных металлопротеиназ в сердце преждевременно рожденных крыс

В. В. Иванова, И. В. Мильто, О. Н. Серебрякова, И. В. Суходоло

642

## ЭКОЛОГИЯ

Разнообразие и динамика сообществ гетеротрофных жгутиконосцев в литорали крупного равнинного водохранилища

Н. Г. Косолапова, Е. В. Кузнецова, Д. Б. Косолапов

649

О периферической крови у трех видов рыб с разной экологией (Scombridae и Bergycidae)

А. И. Никитенко, Г. И. Пронина, А. М. Орлов, Д. В. Артеменков, А. Н. Строганов, В. А. Беляев

661

Микоризные комплексы и их роль в экологии бореальных лесов (Обзор)

С. М. Разгулин

668

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Анализ мтДНК верхнеенисейского (*Thymallus svetovidovi*) и монгольского (*Thymallus brevirostris*) хариусов, уточнение их ареалов

Е. В. Пономарева, А. А. Волков, М. В. Пономарева, Е. А. Шубина

678

# Contents

---

---

No. 6, 2022

---

---

## Cell Biology

Experimental Transplantation of Mesenchymal Stromal Cells as an Approach to Studying Their Differentiation *in vivo* (Review)

*O. V. Payushina, D. A. Tsomartova, Ye. V. Chereshneva, M. Yu. Ivanova, T. A. Lomanovskaya, M. S. Pavlova, and S. L. Kuznetsov*

563

---

## Genetics

Expression of Messenger RNA of Transcription Factors GATA 3, FOXP3, TBX21, STAT3, NFKB1, MAPK8 in Humans and Their Cooperative Interactions in the Long Term after Chronic Radiation Exposure

*V. S. Nikiforov and A. V. Akleyev*

575

---

## Botany

The Regenerative Capacity of Siberian Larch Cell Lines *in vitro*

*I. N. Tretyakova, M. E. Park, N. V. Oreshkova, and V. E. Padutov*

585

---

## Plant Physiology

Elicitor Effect of Yeast Extract on the Accumulation of Phenolic Compounds and Antiradical Activity of *Linum grandiflorum* Cells *in vitro*

*E. A. Goncharuk, O. L. Saibel, G. P. Zaitsev, and N. V. Zagoskina*

597

Identification of Alternative Mitochondrial Oxidase Genes in *Lupinus luteus* and Influence on their Expression of Salicylic Acid

*P. A. Butsanets, N. A. Shugaeva, and A. G. Shugaev*

607

---

## Zoology

Morphological Variability of the Steppe Lemming (*Lagurus lagurus* Pall.) in the Northeast of the Species Range

*T. A. Dupal, S. A. Abramov, and Yu. N. Litvinov*

614

Morpho-Genetic Features of the Siberian Weasel (*Mustela sibirica* Pall.) on the North-Eastern Edge of the Area (Middle Lena Basin, Yakutia)

*E. S. Zakharov, V. M. Safronov, N. N. Zakharova, L. A. Pestryakova, L. P. Koryakina, S. Kruse, and N. A. Bochkarev*

626

---

## Animal and Human Physiology

Chitosan Effect on Blood Coagulation in Heparinized Rats

*L. A. Lyapina, T. Yu. Obergan, M. E. Grigorjeva, and T. A. Shubina*

636

Matrix Metalloproteinases Detection in the Heart of Preterm Rats

*V. V. Ivanova, I. V. Milto, O. N. Serebryakova, and I. V. Sukhodolo*

642

---

## Ecology

Diversity and Community Dynamics of Heterotrophic Flagellates in the Littoral of a Large Plain Reservoir

*N. G. Kosolapova, E. V. Kuznetsova, and D. B. Kosolapov*

649

Peripheral Blood Parameters of Three Species with Different Ecologies (Scombridae and Berycidae)

*A. I. Nikitenko, G. I. Pronina, A. M. Orlov, D. V. Artemenkov, A. N. Stroganov, and V. A. Belayev*

661

Mycorrhizal Complexes and Their Role in the Ecology of Boreal Forests

*S. M. Razgulin*

668

---

## Short Communications

mtDNA Analysis of the Upper Yenisei (*Thymallus svetovidovis*) and Mongolian (*Thymallus brevirostris*) Graylings, Clarification of Their Ranges

*E. V. Ponomareva, A. A. Volkov, M. V. Ponomareva, and E. A. Shubina*

678

---

---

---

**БИОЛОГИЯ**  
**КЛЕТКИ**

---

УДК 57.089.67:57.032:611.018.21

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ  
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КАК ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ  
ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ *in vivo* (ОБЗОР)****© 2022 г. О. В. Паюшина\*, @, Д. А. Цомартова\*, Е. В. Черешнева\*, М. Ю. Иванова\*,  
Т. А. Ломановская\*, М. С. Павлова\*, С. Л. Кузнецов\***

\*Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, ул. Трубецкая, 8, Москва, 119991 Россия

@E-mail: payushina@mail.ru

Поступила в редакцию 02.11.2021 г.

После доработки 09.12.2021 г.

Принята к публикации 10.12.2021 г.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) в настоящее время подвергаются активному исследованию. Знания о потенциях МСК к дифференцировке *in vivo*, получаемые в экспериментах по их трансплантации лабораторным животным, необходимы для лучшего понимания биологии этих клеток и их эффективного клинического применения. МСК могут быть трансплантированы в область тканевого дефекта или в системный кровоток, однако для многих исследовательских задач предпочтительна их эктопическая трансплантация под кожу, под капсулу почки или с использованием диффузионных камер. В обзоре рассмотрена область применения этих методов трансплантации МСК, проанализированы их преимущества и недостатки и систематизированы полученные с их помощью экспериментальные данные.

*Ключевые слова:* мезенхимные стромальные клетки, трансплантация, дифференцировка, экспериментальные модели, скаффолды, диффузионные камеры

DOI: 10.31857/S1026347022060129

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) в настоящее время являются одним из наиболее активно исследуемых типов клеток. Интерес к ним обусловлен как ключевой ролью этих клеток в гистогенезе соединительных тканей, так и актуальностью их применения в регенеративной медицине. Согласно критериям, разработанным Международным обществом клеточной терапии (Dominici *et al.*, 2006), одним из основных признаков принадлежности исследуемых клеток к МСК наряду с адгезивностью к культуральному пластику и определенным антигенным фенотипом (экспрессией CD105, CD73 и CD90 при отсутствии CD45, CD34, HLA-DR, CD14 или CD11b, CD79 $\alpha$  или CD19) служит их способность дифференцироваться *in vitro*, по крайней мере, в трех направлениях – остеогенном, адипогенном и хондрогенном. Для оценки потенций МСК разработаны протоколы их культивирования в присутствии индукторов дифференцировки с последующим цитохимическим или иммуноцитохимическим анализом (Dominici *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Juffroy *et al.*, 2009; Kemp *et al.*, 2011). Такой подход, позволяющий варьировать состав среды и прижизненно наблюдать за состоянием клеток, удобен для анализа молекулярных механизмов, контро-

лирующих их дифференцировку. Однако в клеточной культуре невозможно воспроизвести все условия естественного микроокружения МСК, так что характер их дифференцировки может отличаться от такового *in vivo*. При этом сведения о том, как МСК проявляют свои потенции в естественных условиях организма, имеют не только научную, но и практическую значимость, так как необходимы для эффективного и безопасного клинического применения этих клеток. Этим обусловлены востребованность различных моделей трансплантации МСК экспериментальным животным и актуальность поиска оптимальных способов трансплантации.

Во многих работах МСК вводят в область искусственно созданного тканевого дефекта, прежде всего с целью изучения их роли в регенеративном процессе. Однако известно, что регенеративные эффекты МСК при повреждении различных тканей и органов обусловлены главным образом не дифференцировкой трансплантированных клеток, а паракринной секрецией ими биологически активных веществ (Gneschi *et al.*, 2016; Samsonraj *et al.*, 2017). Эффективность приживания донорских МСК в организме реципиента часто бывает крайне низкой; под влиянием патологически из-

мененного микроокружения они быстро гибнут и спустя длительный срок после трансплантации могут уже не обнаруживаться в тканях (Noiseux *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007; Shou *et al.*, 2018). Многие авторы сообщают, что улучшение состояния поврежденной ткани после трансплантации МСК в область дефекта сопровождается дифференцировкой лишь немногих донорских клеток (Nakamura *et al.*, 2007; Noiseux *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007) или не сопровождается ею вообще (Koronen *et al.*, 2007). Необходимо также учитывать вклад в регенеративный процесс стволовых и родоначальных клеток реципиента, резидентных или приходящих с кровотоком из других тканей. Это обстоятельство затрудняет определение происхождения дифференцированных клеток в зоне дефекта. Проблему частично решает мечение вводимых МСК, но в некоторых случаях, в частности, при трансплантации в поврежденный миокард, отмечен феномен их слияния со зрелыми клетками реципиента (Noiseux *et al.*, 2006; Freeman *et al.*, 2015), так что наличие метки в дифференцированной клетке может быть следствием клеточного слияния, а не истинной дифференцировки.

Аналогичные проблемы возникают при внутривенной трансплантации МСК. При таком способе введения клетки заселяют многие ткани и органы, что позволяет комплексно оценить их дифференцировочный потенциал. Однако число клеток донорского происхождения в тканях реципиента оказывается низким (Li, Niyibizi, 2016), прежде всего из-за оседания значительной части введенных МСК в капиллярах легких (Masterson *et al.*, 2021). В то же время известно, что ряд направлений дифференцировки МСК, в частности, хондрогенез, требуют непосредственных межклеточных взаимодействий (Wang *et al.*, 2020), которые возможны только при высокой локальной концентрации клеток, недостижимой в случае их системного введения. Кроме того, при этом способе трансплантации, как и при введении непосредственно в регенерирующую ткань, не исключено слияние донорских МСК с клетками реципиента, затрудняющее интерпретацию результатов эксперимента (Kemp *et al.*, 2011).

С учетом вышеизложенного предпочтительным для многих исследовательских задач методом анализа потенциалов МСК *in vivo* представляется их эктопическая трансплантация в участки организма, лишённые резидентных клеток-предшественников изучаемой дифференцировки. Такой подход позволяет сократить число экспериментальных переменных, в частности, минимизировать вклад клеток реципиента и влияние факторов микроокружения. В некоторых работах для анализа дифференцировки МСК их трансплантируют экспериментальным животным внутрибрюшинно (Kramann *et al.*, 2013) или внутримышечно (Qu *et al.*, 2011; Tušek *et al.*, 2017), однако эти способы имеют недостатки,

связанные соответственно с трудностью отслеживания судьбы клеток в брюшной полости и возможностью негативного влияния сокращений мышц на трансплантат (DeWard *et al.*, 2014). При внутримышечной трансплантации необходимо также учитывать возможность дифференцировки миосателлитов реципиента в остеогенном направлении, способной исказить результаты эксперимента (Scott *et al.*, 2012). Более перспективными представляются экспериментальные модели трансплантации МСК в подкожную соединительную ткань и под капсулу почки, а также использование закрытой системы, предполагающей помещение трансплантируемых клеток в диффузионную камеру. Эти модели будут рассмотрены в настоящем обзоре.

### ПОДКОЖНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ

Помещение исследуемых клеток под кожу является технически наиболее простым методом их трансплантации. У лабораторных грызунов, наиболее часто используемых в подобных экспериментах, кожа слабо прикреплена к подлежащим тканям, что позволяет сформировать под ней карман, вмещающий большое количество клеток (в том числе при их трансплантации на искусственном носителе), и обеспечить достаточное пространство для роста ткани. При необходимости возможно прижизненное исследование роста трансплантата путем пальпации его через кожу (Juffroy *et al.*, 2009).

Инъекционные под кожу в виде суспензии, МСК образуют в месте введения многоклеточные агрегаты, в которые врастают кровеносные сосуды реципиента (Preda *et al.*, 2020). В некоторых работах была показана возможность остеогенной дифференцировки МСК, пересаженных в виде суспензии (Juffroy *et al.*, 2009) или скрученных в рулон клеточных пластов (Ma *et al.*, 2010), однако в большинстве случаев трансплантируемые клетки заключают в скаффолды, позволяющие создать необходимое для дифференцировки микроокружение. Для анализа остеогенеза МСК трансплантируют на скаффолдах из материалов, сходных по составу с межклеточным веществом костной ткани, таких как коллаген, апатит, гидроксиапатит, трикальцийфосфат или различные их сочетания (Haynesworth *et al.*, 1992; McCarty *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2012; Ueda *et al.*, 2014; Qadir *et al.*, 2015; Calabrese *et al.*, 2017; Suzuki *et al.*, 2017; Weigand *et al.*, 2017; Duan *et al.*, 2018; Wittig *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020). Иногда в качестве носителя используют деминерализованный костный матрикс (Wang *et al.*, 2017), другие натуральные материалы (Yang *et al.*, 2018; Sathy *et al.*, 2019) или синтетические полимеры (Sharma *et al.*, 2018; Larson *et al.*, 2019). Как правило, такие скаффолды имеют пористую или волокнистую структуру, которая создает благоприятные условия для прикрепления

трансплантируемых клеток и вращающаяся костную ткань сосудов реципиента. По некоторым данным, культивирование МСК в остеогенной среде *in vitro* перед их нанесением на скаффолд способствует увеличению количества образуемой ими в организме реципиента костной ткани (Ye *et al.*, 2012), однако другие авторы сообщают о неэффективности предварительной индукции остеогенеза (Weigand *et al.*, 2017).

Хондрогенная дифференцировка МСК была показана при их подкожной трансплантации на полимерных скаффолдах, имеющих сетчатую структуру (Cui *et al.*, 2006; McCarty *et al.*, 2009; Larson *et al.*, 2019) или представляющих собой микро-сферы (Kuznetsov *et al.*, 2019). Клетки, как правило, предварительно инкубируют в индукционной среде (Cui *et al.*, 2006) или включают индукторы хондрогенеза в состав скаффолда (McCarty *et al.*, 2009), однако дифференцировка МСК в этом направлении может происходить и в отсутствие экзогенных индукторов (Kuznetsov *et al.*, 2019). Иногда хондрогенез в трансплантатах наблюдается одновременно с остеогенезом (Ma *et al.*, 2010; Larson *et al.*, 2019; Sathy *et al.*, 2019), при этом в случае использования пористых носителей может быть отмечено неординарное распределение костной и хрящевой тканей в трансплантате: остеогенез преобладает в сообщающихся порах, а хондрогенез – в порах с закрытыми концами, куда затруднено проникновение сосудов реципиента (Pittenger, Marshak, 2001). Очевидно, такая локализация хрящевой ткани отражает характерную для нее низкую потребность в кислороде.

Сообщения об адипогенной дифференцировке трансплантированных под кожу МСК немногочисленны. В частности, адипоциты, имеющие, вероятно, донорское происхождение, были обнаружены в связи с эктопической костью, развивающейся из МСК на скаффолдах из кальцийфосфатной керамики (McCarty *et al.*, 2009; Ueda *et al.*, 2014) или без скаффолда (Juffroy *et al.*, 2009). Крупные скопления адипоцитов образовывались под кожей мышцей, получивших стромальные клетки из подкожной жировой ткани на скаффолде из фиброина шелка (Frazier *et al.*, 2016). Метод подкожной трансплантации позволяет также выявить потенциалы МСК к дифференцировке в эндотелий (Sharma *et al.*, 2018; Ljung *et al.*, 2019) и кроветворную строму, способную поддерживать дифференцировку кроветворных клеток реципиента (McCarty *et al.*, 2009; Ueda *et al.*, 2014).

В табл. 1 приведены основные материалы скаффолдов для трансплантации МСК под кожу экспериментальных животных и полученные с их использованием результаты. Многие из этих материалов перспективны для тканевой инженерии, и метод подкожной трансплантации позволяет тестировать их на совместимость с организмом

реципиента. В числе других задач, которые могут быть решены с помощью данной экспериментальной модели, можно назвать оценку влияния условий культивирования МСК на их потенциалы (Wittig *et al.*, 2018), изучение возможности стимуляции дифференцировки воздействием на организм реципиента тех или иных факторов – например, ультразвука низкой интенсивности (Cui *et al.*, 2006), а также выяснение молекулярных механизмов регуляции дифференцировки МСК путем изменения экспрессии генов цитокинов (Yang *et al.*, 2018) или микроРНК (Qadir *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2020) во вводимых клетках.

Однако из-за малого количества кровеносных сосудов в подкожной соединительной ткани и, как следствие, недостаточного кровоснабжения трансплантата его клетки могут не в полной мере проявлять свою способность к росту и дифференцировке. Известно, в частности, что костная ткань после имплантации остеоиндуктивных материалов под кожу образуется в меньшем количестве и позднее, чем в других экспериментальных моделях эктопического остеогенеза (Scott *et al.*, 2012).

## ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ПОД КАПСУЛУ ПОЧКИ

Метод трансплантации МСК под капсулу почки технически сложнее подкожной трансплантации, но, в отличие от последней, обеспечивает значительно лучшие условия для приживания донорских клеток в связи с обильным кровоснабжением. Дополнительным преимуществом является легкость поиска и идентификации трансплантата, тогда как под кожей он может быть макроскопически трудноотличим от окружающих тканей и мигрировать на значительное расстояние от места операции (Scott *et al.*, 2012). В качестве реципиента в данной экспериментальной модели используют, как правило, мышшь, так как у этого вида животных капсула почки достаточно прочна и легко отделяется от паренхимы. Это позволяет вводить трансплантируемый материал в пространство между капсулой и тканью почки путем инъекции либо через небольшой разрез на капсуле. Анатомические особенности строения почки крысы затрудняют проведение трансплантации подобным образом, однако успешное приживание трансплантируемых клеток возможно при их помещении в поверхностный надрез почечной паренхимы (Паюшина и др., 2011, 2017).

Имеющиеся в литературе данные о различных вариантах применения описываемой экспериментальной модели приведены в табл. 2. МСК могут быть введены под капсулу почки в виде суспензии (Zhu *et al.*, 2021), клеточного конгломерата, полученного центрифугированием (Yu *et al.*, 2006) или соскребанием клеточного пласта (Сац и др., 2015), либо на носителях. В связи с риском повре-

Таблица 1. Подкожная трансплантация МСК

| Материал скаффолда                 | Источник МСК   | Реципиент | Наблюдаемая дифференцировка                 | Ссылка  |
|------------------------------------|--|-----------|---|---|
| —                                  | Костный мозг мыши (постоянная линия)                 | Мышь      | Остеогенез, адипогенез                      | Juffroy <i>et al.</i> , 2009                              |
|                                    | Костный мозг кролика                                 | Мышь      | Остеогенез, хондрогенез                     | Ma <i>et al.</i> , 2010                                   |
| ТКФ                                | Костный мозг человека                                | Мышь      | Остеогенез                                  | Haynesworth <i>et al.</i> , 1992; Ye <i>et al.</i> , 2012 |
|                                    | Пульпа зуба человека                                 | Мышь      | Остеогенез                                  | Zhang <i>et al.</i> , 2020                                |
| ГА                                 | Костный мозг овцы                                    | Овца      | Остеогенез                                  | Weigand <i>et al.</i> , 2017                              |
|                                    | Жировая ткань мыши                                   | Мышь      | Остеогенез, кроветворная строма, адипогенез | Ueda <i>et al.</i> , 2014                                 |
| Апатитовое волокно                 | Костный мозг крысы                                   | Крыса     | Остеогенез                                  | Suzuki <i>et al.</i> , 2017                               |
| ГА/ТКФ                             | Костный мозг человека                                | Мышь      | Остеогенез, адипогенез                      | Qadir <i>et al.</i> , 2015                                |
|                                    | Костный мозг и периферическая кровь мыши или кролика | Мышь      | Остеогенез                                  | Park <i>et al.</i> , 2019                                 |
|                                    | Костный мозг и жировая ткань лошади                  |           | Остеогенез                                  | Duan <i>et al.</i> , 2018                                 |
|                                    | Костный мозг овцы                                    | Мышь      | Остеогенез, кроветворная строма, адипогенез | McCarty <i>et al.</i> , 2009                              |
| Коллаген                           | Костный мозг человека                                | Мышь      | Остеогенез                                  | Wittig <i>et al.</i> , 2018                               |
| Деминерализованный костный матрикс | Костный мозг крысы                                   | Мышь      | Остеогенез                                  | Wang <i>et al.</i> , 2017                                 |
| Коллаген/ГА                        | Жировая ткань человека                               | Мышь      | Остеогенез                                  | Calabrese <i>et al.</i> , 2017                            |
| Альгинат                           | Костный мозг свиньи                                  | Мышь      | Остеогенез, хондрогенез                     | Sathy <i>et al.</i> , 2019                                |
| ПКЛ                                | Костный мозг человека                                | Мышь      | Остеогенез хондрогенез                      | Larson <i>et al.</i> , 2019                               |
| ПЛ-ко-КЛ                           | Костный мозг человека                                | Мышь      | Остеогенез эндотелий                        | Sharma <i>et al.</i> , 2018                               |
| ПГК                                | Костный мозг кролика                                 | Мышь      | Хондрогенез                                 | Cui <i>et al.</i> , 2006                                  |
| Желатин                            | Костный мозг овцы                                    | Мышь      | Хондрогенез                                 | McCarty <i>et al.</i> , 2009                              |
| Фибрин/ГК                          | Костный мозг человека                                | Мышь      | Хондрогенез                                 | Kuznetsov <i>et al.</i> , 2019                            |
| Фиброин шелка                      | Жировая ткань мыши                                   | Мышь      | Адипогенез                                  | Frazier <i>et al.</i> , 2016                              |
| Матригель                          | Пуповина человека                                    | Мышь      | Остеогенез                                  | Yang <i>et al.</i> , 2018                                 |
|                                    | Сердце плода человека                                | Мышь      | Эндотелий                                   | Ljung <i>et al.</i> , 2019                                |

Примечания. ГА – гидроксиапатит, ГК – гиалуроновая кислота, ПГК – полигликолевая кислота, ПКЛ – поли-ε-капролактон, ПЛ-ко-КЛ – поли-L-лактид-ко-ε-капролактон, ТКФ – трикальцийфосфат.

ждения капсулы жестким материалом, таким как кальцийфосфатная керамика, в качестве носителей в этой модели, как правило, используют микросферы (Gurevich *et al.*, 2002; Trouche *et al.*, 2010), гели (Li *et al.*, 2014; Hashmi *et al.*, 2017; Gurung *et al.*, 2018) или мягкие губки (Prigozhina *et al.*, 2008; Чайлахян и др., 2014; O'Neill *et al.*, 2019). В этих условиях МСК костномозгового происхождения образуют под капсулой почки реципиента костную ткань и регенерируют строму костного мозга, способную поддерживать гемопоэз (Gurevich *et al.*, 2002; Prigozhina *et al.*, 2008; Чайлахян и др., 2014; Сац и др., 2015). Сходные результаты были получены и при трансплантации МСК из некоторых других источников, в частности, плаценты и пуповины (Prigozhina *et al.*, 2008), тогда как мезенхимные клетки зубного сосочка воспроизводили морфогенез зуба с образованием одонтобластов, предентина и дентина (Yu *et al.*, 2006). Впрочем, путем механического сжатия носителя удавалось также добиться однотогенной дифференцировки МСК костного мозга, трансплантированных в полимерном геле (Hashmi *et al.*, 2017). Показана и возможность индукции дифференцировки МСК в нетипичном для них направлении – в эпителий простаты; для этого их трансплантировали совместно с клетками мочепоолового синуса, а животным-реципиентам ввели тестостерон (Li *et al.*, 2014).

Анализ дифференцировки МСК под капсулой почки реципиента возможен также при трансплантации клеток в их естественном микроокружении, в составе тканевых фрагментов кроветворных и других органов. В случае пересадки кроветворных органов исходно содержащиеся в них гемопоэтические клетки гибнут, а стромальные предшественники проявляют потенции к хрящевой и/или костной дифференцировке, наличие и выраженность которых зависят от видовой и органной принадлежности клеток. В частности, в трансплантатах печени зародышей мыши первоначально формируется хрящевая ткань, которая к 12–14-м суткам после операции замещается костью с костномозговым органом (Старостин, Домарацкая, 2001), тогда как при пересадке печени зародышей крысы хрящевая ткань сохраняется более месяца, не сменяясь костной (Паюшина и др., 2011). В трансплантатах костного мозга различных видов животных образуется костная раковина с кроветворной стромой, иногда содержащей адипоциты (Bainton *et al.*, 1986; Schofield, 1986; Паюшина и др., 2017), а в трансплантированных фрагментах селезенки стромальные клетки не проявляют ни остеогенных, ни хондрогенных потенций (Shatry, Levi, 2004), как и при их пересадке на коллагеновом носителе после культивирования *in vitro* (O'Neill *et al.*, 2019). Строма, образующаяся в таких трансплантатах, заселяется кроветворными клетками реципиента и сохраняет присущую

исходному органу способность к поддержанию гемопоэза (Bainton *et al.*, 1986; Schofield, 1986; Старостин, Домарацкая, 2001; Shatry, Levi, 2004; Паюшина и др., 2017). Благодаря этому обстоятельству экспериментальная модель трансплантации тканевых фрагментов (как и выделенных из них МСК) под капсулу почки широко используется для оценки не только дифференцировочного потенциала МСК, но и их способности к организации кроветворного микроокружения.

## ТРАНСПЛАНТАЦИЯ В ДИФФУЗИОННЫХ КАМЕРАХ

При всех достоинствах экспериментальных моделей трансплантации МСК под кожу или под капсулу почки, они не позволяют исключить вклад клеток реципиента в формирование ткани на месте трансплантации. Несмотря на отсутствие или малочисленность резидентных стромальных предшественников в этих локализациях, они могут мигрировать в область трансплантации под влиянием хемоаттрактантов, выделяемых поврежденной хирургическим вмешательством тканью. В этой связи получили распространение методы экспериментальной трансплантации МСК в замкнутых системах, таких как диффузионные камеры. Размер пор в их стенках обеспечивает свободный обмен макромолекулами между трансплантатом и его окружением, но предотвращает миграцию клеток, что позволяет однозначно установить донорское происхождение ткани, образующейся внутри камеры. Диффузионные камеры могут быть помещены в брюшную полость (Фриденштейн и др., 1970; Friedenstein *et al.*, 1987; Mardon *et al.*, 1987; Bab *et al.*, 1988; Bruder *et al.*, 1990; Haynesworth *et al.*, 1992; Gundle *et al.*, 1997; Date *et al.*, 2004; Yagami *et al.*, 2004; Паюшина и др., 2017; Mohanram *et al.*, 2020), под кожу (Tsuchiya *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2010, 2014; Yagami *et al.*, 2011; Claros *et al.*, 2014) или в субфасциальное пространство (Nawata *et al.*, 2005); судя по имеющимся данным, характер дифференцировки находящихся в них МСК не обнаруживает явной зависимости от места имплантации (табл. 3).

В ранних работах в диффузионных камерах трансплантировали, как правило, суспензию свежее выделенных клеток костного мозга, что позволяло выявить остеогенные и хондрогенные потенции содержащихся в нем стромальных предшественников (Mardon *et al.*, 1987; Bab *et al.*, 1988; Bruder *et al.*, 1990). Однако, как и при использовании вышеописанных экспериментальных моделей, МСК могут быть предварительно размножены *in vitro*. При этом возможно их помещение в камеру как в виде суспензии (Фриденштейн и др., 1970; Friedenstein *et al.*, 1987; Haynesworth *et al.*, 1992; Tsuchiya *et al.*, 2003; Nawata *et al.*, 2005; Паюшина и др., 2017), так и на скаффолде (Gundle *et al.*,

**Таблица 2.** Трансплантация МСК под капсулу почки

| Трансплантат                                  | Источник МСК                          | Реципиент | Наблюдаемая дифференцировка  | Ссылка                          |
|---|---------------------------------------|-----------|--|---------------------------------|
| Суспензия клеток                              | Эндометрий человека                   | Мышь      | Эндотелий, строма эндометрия   | Zhu <i>et al.</i> , 2021        |
| Сгусток клеток                                | Зубной сосочек крысы                  | Крыса     | Дентин   | Yu <i>et al.</i> , 2006         |
| Пласт клеток                                  | Костный мозг мыши                     | Мышь      | Остеогенез, кроветворная строма  | Сац и др., 2015                 |
| Клетки на альгинатных микросферах             | Костный мозг крысы                    | Крыса     | н/а  | Trouche <i>et al.</i> , 2010    |
| Клетки на фибриновых микросферах              | Костный мозг мыши                     | Мышь      | Остеогенез, кроветворная строма  | Gurevich <i>et al.</i> , 2002   |
| Клетки на деминерализованном костном матриксе | Костный мозг, плацента, пуповина мыши | Мышь      | Остеогенез, кроветворная строма  | Prigozhina <i>et al.</i> , 2008 |
| Клетки на желатиновой губке                   | Костный мозг мыши                     | Мышь      | Остеогенез, кроветворная строма  | Чайлахян и др., 2014            |
| Клетки на коллагеновой губке                  | Селезенка мыши                        | Мышь      | Кроветворная строма  | O'Neill <i>et al.</i> , 2019    |
| Клетки в фибриновом геле                      | Эндометрий человека                   | Мышь      | н/а  | Gurung <i>et al.</i> , 2018     |
| Клетки в геле на основе ПИПАА                 | Костный мозг мыши                     | Мышь      | Дентин   | Hashmi <i>et al.</i> , 2017     |
| Клетки в коллагеновом геле                    | Пуповина человека                     | Мышь      | Эпителий простаты (при трансплантации совместно с клетками мочепоолового синуса плода крысы) | Li <i>et al.</i> , 2014         |
| Тканевой фрагмент                             | Костный мозг мыши                     | Мышь      | Остеогенез, кроветворная строма  | Schofield, 1986                 |
|   | Костный мозг кролика                  | Кролик    | Остеогенез, адипогенез, кроветворная строма  | Bainton <i>et al.</i> , 1986    |
|   | Костный мозг, кость плода крысы       | Крыса     | Остеогенез, адипогенез, кроветворная строма  | Паюшина и др., 2017             |
|   | Пульпа зуба мыши                      | Мышь      | Остеогенез, хондрогенез, дентин  | Braut <i>et al.</i> , 2003      |
|   | Печень плода мыши                     | Мышь      | Остеогенез, хондрогенез, кроветворная строма   | Старостин, Домарацкая, 2001     |
|   | Печень плода крысы                    | Крыса     | Хондрогенез  | Паюшина и др., 2011             |
|   | Селезенка мыши                        | Мышь      | Кроветворная строма  | Shatry, Levi, 2004              |

Примечание. н/а – не анализировали; ПИПАА – поли-*N*-изопропилакриламид.

Таблица 3. Трансплантация МСК в диффузионных камерах

| Материал скаффолда                   | Источник МСК                          | Реципиент и место трансплантации | Наблюдаемая дифференцировка   | Ссылка                            |
|--------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|---|-----------------------------------|
| –                                    | Костный мозг кролика                  | Кролик в/б                       | Остеогенез, онхрогенез  | Friedenstein <i>et al.</i> , 1987 |
|                                      | Костный мозг крысы*                   | Крыса в/б                        | Остеогенез, хондрогенез, волокнистая соединительная ткань             | Mardon <i>et al.</i> , 1987       |
|                                      | Костный мозг крысы, кость плода крысы | Крыса в/б                        | Остеогенез, хондрогенез   | Паюшина и др., 2017               |
|                                      | Костный мозг человека*                | Мышь в/б                         | Остеогенез, хондрогенез   | Bab <i>et al.</i> , 1988          |
|                                      | Костный мозг человека                 | Мышь в/б                         | Волокнистая соединительная ткань                                      | Haynesworth <i>et al.</i> , 1992  |
|                                      | Костный мозг мыши**                   | Мышь п/к                         | Хондрогенез   | Tsuchiya <i>et al.</i> , 2003     |
|                                      | Костный мозг цыпленка*                | Мышь в/б                         | Остеогенез хондрогенез  | Bruder <i>et al.</i> , 1990       |
|                                      | Селезенка морской свинки              | Морская свинка в/б               | Остеогенез (при трансплантации совместно с эпителием мочевого пузыря) | Фриденштейн и др., 1970           |
|                                      | Мышцы плода крысы                     | Крыса в/м                        | Хондрогенез   | Nawata <i>et al.</i> , 2005       |
|                                      | Линия USAC (человек)                  | Мышь в/б                         | Остеогенез, хондрогенез адипогенез                                    | Yagami <i>et al.</i> , 2004       |
| Коллагеновый гель                    | Линия СЗН10Т1/2 (мышь)                | Мышь в/б                         | Остеогенез, хондрогенез, адипогенез                                   | Date <i>et al.</i> , 2004         |
|                                      | Костный мозг кролика                  | Кролик п/к                       | Хондрогенез   | Zheng <i>et al.</i> , 2010        |
|                                      | Костный мозг крысы                    | Крыса п/к                        | Остеогенез, хондрогенез   | Claros <i>et al.</i> , 2014       |
| ТКФ                                  | Костный мозг собаки                   | Собака п/к                       | Остеогенез  | Yagami <i>et al.</i> , 2011       |
| ГА/ТКФ                               | Костный мозг человека                 | Мышь в/б                         | Остеогенез, хондрогенез   | Gundle <i>et al.</i> , 1997       |
| ГА                                   | Пульпа зуба человека                  | Мышь в/б                         | Остеогенез  | Mohanram <i>et al.</i> , 2020     |
| Са-фосфатная керамика, фиброин шелка | Костный мозг кролика                  | Кролик п/к                       | волокнистая соединительная ткань                                      | Zheng <i>et al.</i> , 2014        |

Примечания. в/б – внутрибрюшинно, в/м – внутримышечно, п/к – подкожно; ГА – гидроксиапатит, ТКФ – трикальций-фосфат; \* – свежевыделенный костный мозг; \*\* – трансплантируемые клетки трансфицировали геном *Sox-9*.

**Таблица 4.** Сравнение моделей эктопической трансплантации МСК

| Характеристики   | Подкожная трансплантация | Трансплантация под капсулу почки | Трансплантация в диффузионных камерах |
|--|--------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| Техническая простота                                       | +                        | –                                | ±                                     |
| Возможность трансплантации больших объемов материала       | +                        | –                                | –                                     |
| Кровоснабжение   | ±                        | +                                | –                                     |
| Миграция клеток из места трансплантации                    | +                        | –                                | –                                     |
| Возможность проникновения клеток реципиента в трансплантат | +                        | +                                | –                                     |

1997; Zheng *et al.*, 2010, 2014; Yagami *et al.*, 2011; Claros *et al.*, 2014; Mohanram *et al.*, 2020). Результаты экспериментов при этом, как правило, сопоставимы с таковыми при трансплантации некультивированных клеток: МСК из большинства источников дифференцируются в остеогенном и/или хондрогенном направлении (Friedenstein *et al.*, 1987; Gundle *et al.*, 1997; Nawata *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2010; Yagami *et al.*, 2011; Claros *et al.*, 2014; Паюшина и др., 2017; Mohanram *et al.*, 2020). Адипогенез был показан только для постоянных линий мультипотентных стромальных предшественников, а именно USAC, полученной из остеосаркомы человека (Yagami *et al.*, 2004) и СЗН10Т1/2 из крыши черепа зародыша мыши (Date *et al.*, 2004), причем в последнем случае он требовал добавления в диффузионную камеру костного морфогенетического белка-2 (BMP-2).

Следует отметить, что отсутствие кровоснабжения и невозможность прямых регуляторных взаимодействий с клетками реципиента могут затруднять дифференцировку МСК в диффузионных камерах. В частности, она может не происходить без предварительной индукции *in vitro* (Gundle *et al.*, 1997; Claros *et al.*, 2014), добавления индукторов в имплантируемые камеры (Nawata *et al.*, 2005) или трансфекции клеток генами, кодирующими определенные факторы транскрипции (Tsuchiya *et al.*, 2003). Показательны результаты сравнения дифференцировки МСК из костного мозга человека при трансплантации иммунодефицитным мышам внутрибрюшинно в диффузионных камерах и подкожно в пористых керамических блоках: в первом случае образовывалась только волокнистая соединительная ткань, тогда как во втором – костная (Haynesworth *et al.*, 1992). Тем не менее данная экспериментальная модель, как и описанные выше, успешно применяется в целях тестирования скаффолдов для тканевой инженерии (Nawata *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2014; Yagami *et al.*, 2011), сравнительной оценки потенциалов МСК из разных источников (Bab *et al.*, 1988; Паюшина и др., 2017), анализа молекулярных механизмов регуляции дифференцировки (Tsuchiya *et al.*, 2003).

Основные характеристики рассмотренных моделей эктопической трансплантации МСК обобщены в табл. 4.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальные модели эктопической трансплантации МСК, находящихся в составе тканевых фрагментов, свежевыделенных или предварительно размноженных *in vitro*, были разработаны еще на начальном этапе изучения свойств стромальных клеток-предшественников в последней трети XX века и до сих пор продолжают успешно применяться для анализа особенностей дифференцировки этих клеток в условиях *in vivo*. Каждая из описанных моделей имеет свои преимущества и недостатки, определяющие область ее применения. Так, подкожная трансплантация предпочтительна для пересадки больших объемов материала, в том числе на керамических скаффолдах; пересадка под капсулу почки технически сложна и связана с ограничениями на размер трансплантата и материал носителя, однако богатое кровоснабжение во многих случаях позволяет добиться наилучшего приживления и наиболее выраженной дифференцировки клеток; трансплантация в диффузионных камерах исключает непосредственный контакт между клетками донора и реципиента, что, с одной стороны, облегчает интерпретацию результатов эксперимента, но с другой – создает неоптимальные условия для дифференцировки и не позволяет исследовать прямые межклеточные взаимодействия, в частности, способность пересаженных клеток к поддержанию гемопоза. Несомненную ценность для биомедицинской науки имеют и другие методы введения исследуемых клеток в организм животного-реципиента, такие как их инъекция в системный кровоток или локальная трансплантация в область повреждения ткани. Использование всех этих экспериментальных моделей позволяет получить информацию о взаимодействии МСК с организмом и регуляции их дифференцировки тканевым микроокружением, важную для фундаментальной науки и практической медицины.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Паюшина О.В., Буторина Н.Н., Никонова Т.М., Кожевникова М.Н., Шевелева О.Н., Старостин В.И. Сравнительное исследование клонального роста и дифференцировки мезенхимных стромальных клеток из печени зародышей крысы на разных сроках пренатального развития // Цитология. 2011. Т. 53. № 11. С. 859–867.
- Паюшина О.В., Буторина Н.Н., Шевелева О.Н., Бухинник С.С., Березина А.А., Рамазанова С.Г., Домарацкая Е.И. Сравнительное исследование мезенхимных стромальных клеток костного мозга на разных стадиях индивидуального развития // Онтогенез. 2017. Т. 48. № 4. С. 315–324.
- Сац Н.В., Шипунова И.Н., Бигильдеев А.Е., Костюшев Д.С., Дризе Н.И. Особенности переноса гена в мезенхимальные стволовые клетки // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2015. № 1. С. 21–24.
- Старостин В.И., Домарацкая Е.И. Хондро- и остеогенез в эктопических трансплантатах печени зародышей мышей // Онтогенез. 2001. Т. 32. № 2. С. 114–117.
- Фриденштейн А.Я., Чайлахян Р.К., Лалыкина К.С. О фибробластоподобных клетках в культурах кроветворной ткани морских свинок // Цитология. 1970. Т. 12. № 9. С. 1147–1155.
- Чайлахян Р.К., Юсутов В.И., Горская Ю.Ф., Куралесова А.И., Герасимов Ю.В., Свиридов А.П., Тамбиев А.Х., Воробьева Н.Н., Прошева А.Г., Шишкова В.В., Москвина И.Л., Баграташвили В.Н. Эффекты акустического и КВЧ-воздействия на мультипотентные стромальные клетки при формировании гетеротопных костномозговых органов в тканеинженерных конструкциях // Бюлл. эксп. биол. мед. 2014. Т. 158. № 11. С. 640–644.
- Bab I., Passi-Even L., Gazit D., Sekeles E., Ashton B.A., Peylan-Ramu N., Ziv I., Ulmansky M. Osteogenesis in in vivo diffusion chamber cultures of human marrow cells // Bone Miner. 1988. V. 4. № 4. P. 373–386.
- Bainton D.F., Maloney M.A., Patt H.M., Stern R. Characterization of rabbit stromal fibroblasts derived from red and yellow bone marrow // J. Exp. Med. 1986. V. 163. № 2. P. 400–413.
- Braut A., Kollar E.J., Mina M. Analysis of the odontogenic and osteogenic potentials of dental pulp in vivo using a Colla1-2.3-GFP transgene // Int. J. Dev. Biol. 2003. V. 47. № 4. P. 281–292.
- Bruder S.P., Gazit D., Passi-Even L., Bab I., Caplan A.I. Osteochondral differentiation and the emergence of stage-specific osteogenic cell-surface molecules by bone marrow cells in diffusion chambers // Bone Miner. 1990. V. 11. № 2. P. 141–151.
- Calabrese G., Giuffrida R., Forte S., Fabbì C., Figallo E., Salvatorelli L., Memeo L., Parenti R., Gulisano M., Gulino R. Human adipose-derived mesenchymal stem cells seeded into a collagen-hydroxyapatite scaffold promote bone augmentation after implantation in the mouse // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 7110.
- Claros S., Rico-Llanos G.A., Becerra J., Andrades J.A. A novel human TGF- $\beta$ 1 fusion protein in combination with rhBMP-2 increases chondro-osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells // Int. J. Mol. Sci. 2014. V. 15. № 7. P. 11255–11274.
- Cui J.H., Park K., Park S.R., Min B.H. Effects of low-intensity ultrasound on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells embedded in polyglycolic acid: an in vivo study // Tissue Eng. 2006. V. 12. № 1. P. 75–82.
- Date T., Doiguchi Y., Nobuta M., Shindo H. Bone morphogenetic protein-2 induces differentiation of multipotent C3H10T1/2 cells into osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes in vivo and in vitro // J. Orthop. Sci. 2004. V. 9. № 5. P. 503–508.
- DeWard A.D., Komori J., Lagasse E. Ectopic transplantation sites for cell-based therapy // Curr. Opin. Organ Transplant. 2014. V. 19. № 2. P. 169–174.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy. 2006. V. 8. № 4. P. 315–317.
- Duan W., Chen C., Haque M., Hayes D., Lopez M.J. Polymer-mineral scaffold augments in vivo equine multipotent stromal cell osteogenesis // Stem Cell Res. Ther. 2018. V. 9. № 1. P. 60.
- Frazier T.P., Bowles A., Lee S., Abbott R., Tucker H.A., Kaplan D., Wang M., Strong A., Brown Q., He J., Bunnell B.A., Gimple J.M. Serially transplanted nonpericytic CD146(-) adipose stromal/stem cells in silk bioscaffolds regenerate adipose tissue in vivo // Stem Cells. 2016. V. 34. № 4. P. 1097–1111.
- Freeman B.T., Kouris N.A., Ogle B.M. Tracking fusion of human mesenchymal stem cells after transplantation to the heart // Stem Cells Transl. Med. 2015. V. 4. № 6. P. 685–694.
- Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K., Gerasimov U.V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers // Cell Tissue Kinet. 1987. V. 20. № 3. P. 263–272.
- Gnecchi M., Danieli P., Malpasso G., Ciuffreda M.C. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cells in tissue repair // Methods Mol. Biol. 2016. V. 1416. P. 123–146.
- Gundle R., Joyner C.J., Triffitt J.T. Interactions of human osteoprogenitors with porous ceramic following diffusion chamber implantation in a xenogeneic host // J. Mater. Sci. Mater. Med. 1997. V. 8. № 8. P. 519–523.
- Gurevich O., Vexler A., Marx G., Prigozhina T., Levdansky L., Slavin S., Shimeliovich I., Gorodetsky R. Fibrin microbeads for isolating and growing bone marrow-derived progenitor cells capable of forming bone tissue // Tissue Eng. 2002. V. 8. № 4. P. 661–672.
- Gurung S., Deane J.A., Darzi S., Werkmeister J.A., Gargett C.E. In vivo survival of human endometrial mesenchymal stem cells transplanted under the kidney capsule of immunocompromised mice // Stem Cells Dev. 2018. V. 27. № 1. P. 35–43.
- Hashmi B., Mammoto T., Weaver J., Ferrante T., Jiang A., Ji-ang E., Feliz J., Ingber D.E. Mechanical induction of dentin-like differentiation by adult mouse bone marrow stromal cells using compressive scaffolds // Stem Cell Res. 2017. V. 24. P. 55–60.

- Haynesworth S.E., Goshima J., Goldberg V.M., Caplan A.I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow // *Bone*. 1992. V. 13. № 1. P. 81–88.
- Juffroy O., Noël D., Delanoye A., Viltart O., Wolowczuk I., Verwaerde C. Subcutaneous graft of D1 mouse mesenchymal stem cells leads to the formation of a bone-like structure // *Differentiation*. 2009. V. 78. № 4. P. 223–231.
- Kemp K., Gordon D., Wraith D.C., Mallam E., Hartfield E., Uney J., Wilkins A., Scolding N. Fusion between human mesenchymal stem cells and rodent cerebellar Purkinje cells // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2011. V. 37. № 2. P. 166–178.
- Koponen J.K., Kekarainen T. E., Heinonen S., Laitinen A., Nystedt J., Laine J., Ylä-Herttuala S. Umbilical cord blood-derived progenitor cells enhance muscle regeneration in mouse hindlimb ischemia model // *Mol. Ther.* 2007. V. 15. № 12. P. 2172–2177.
- Kramann R., Kunter U., Brandenburg V.M., Leisten I., Ehling J., Klinkhammer B.M., Knüchel R., Floege J., Schneider R.K. Osteogenesis of heterotopically transplanted mesenchymal stromal cells in rat models of chronic kidney disease // *J. Bone Miner. Res.* 2013. V. 28. № 12. P. 2523–2534.
- Kuznetsov S.A., Hailu-Lazmi A., Cherman N., de Castro L.F., Robey P.G., Gorodetsky R. In vivo formation of stable hyaline cartilage by naïve human bone marrow stromal cells with modified fibrin microbeads // *Stem Cells Transl. Med.* 2019. V. 8. № 6. P. 586–592.
- Larson B.L., Yu S.N., Park H., Estes B.T., Moutos F.T., Bloomquist C.J., Wu P.B., Welter J.F., Langer R., Guilak F., Freed L.E. Chondrogenic, hypertrophic, and osteochondral differentiation of human mesenchymal stem cells on three-dimensionally woven scaffolds // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2019. V. 13. № 8. P. 1453–1465.
- Li F., Niyibizi C. Engraftability of murine bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cell subpopulations in the tissues of developing mice following systemic transplantation // *Cells Tissues Organs*. 2016. V. 201. № 1. P. 14–25.
- Li W., Ye B., Cai X.Y., Lin J.H., Gao W.Q. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into prostate-like epithelial cells in vivo // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 7. P. e102657.
- Ljung K., Grönlund A., Felldin U., Rodin S., Corbascio M., Österholm C., Grinnemo K.H. Human fetal cardiac mesenchymal stromal cells differentiate in vivo into endothelial cells and contribute to vasculogenesis in immunocompetent mice // *Stem Cells Dev.* 2019. V. 28. № 5. P. 310–318.
- Ma D., Ren L., Liu Y., Chen F., Zhang J., Xue Z., Mao T. Engineering scaffold-free bone tissue using bone marrow stromal cell sheets // *J. Orthop. Res.* 2010. V. 28. № 5. P. 697–702.
- Mardon H.J., Bee J., von der Mark K., Owen M.E. Development of osteogenic tissue in diffusion chambers from early precursor cells in bone marrow of adult rats // *Cell Tissue Res.* 1987. V. 250. № 1. P. 157–165.
- Masterson C.H., Tabuchi A., Hogan G., Fitzpatrick G., Kerrigan S.W., Jerkic M., Kuebler W.M., Laffey J.G., Curley G.F. Intra-vital imaging of mesenchymal stromal cell kinetics in the pulmonary vasculature during infection // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1. P. 5265.
- McCarty R.C., Gronthos S., Zannettino A.C., Foster B.K., Xian C.J. Characterisation and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells // *J. Cell. Physiol.* 2009. V. 219. № 2. P. 324–333.
- Mohanram Y., Zhang J., Tsiridis E., Yang X.B. Comparing bone tissue engineering efficacy of HDPPSCs, HBM-SCs on 3D biomimetic ABM-P-15 scaffolds in vitro and in vivo // *Cytotechnology*. 2020. V. 72. № 5. P. 715–730.
- Nakamura Y., Wang X., Xu C., Asakura A., Yoshiyama M., From A.H., Zhang J. Xenotransplantation of long-term-cultured swine bone marrow-derived mesenchymal stem cells // *Stem Cells*. 2007. V. 25. № 3. P. 612–620.
- Nawata M., Wakitani S., Nakaya H., Tanigami A., Seki T., Nakamura Y., Saito N., Sano K., Hidaka E., Takaoka K. Use of bone morphogenetic protein 2 and diffusion chambers to engineer cartilage tissue for the repair of defects in articular cartilage // *Arthritis Rheum.* 2005. V. 52. № 1. P. 155–163.
- Noiseux N., Gnecci M., Lopez-Illasaca M., Zhang L., Solomon S.D., Deb A., Dzau V.J., Pratt R.E. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation // *Mol. Ther.* 2006. V. 14. № 6. P. 840–850.
- O'Neill H.C., Lim H.K., Periasamy P., Kumarappan L., Tan J.K.H., O'Neill T.J. Transplanted spleen stromal cells with osteogenic potential support ectopic myelopoiesis // *PLoS One*. 2019. V. 14. № 10. P. e0223416.
- Park Y.K., Heo S.J., Koak J.Y., Park G.S., Cho T.J., Kim S.K., Cho J. Characterization and differentiation of circulating blood mesenchymal stem cells and the role of phosphatidylinositol 3-kinase in modulating the adhesion // *Int. J. Stem Cells*. 2019. V. 12. № 2. P. 265–278.
- Pittenger M., Marshak D.R. Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow // *Stem Cell Biology* / Eds. Marshak D.R., Gottlieb D., Gardner R. N-Y., Cold Spring Harbor: The Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. P. 349–373.
- Preda M.B., Lupan A.M., Neculachi C.A., Leti L.I., Fenyó I.M., Popescu S., Rusu E.G., Marinescu C.I., Simionescu M., Burlacu A. Evidence of mesenchymal stromal cell adaptation to local microenvironment following subcutaneous transplantation // *J. Cell. Mol. Med.* 2020. V. 24. № 18. P. 10889–10897.
- Prigozhina T.B., Khitrin S., Elkin G., Eizik O., Morecki S., Slavin S. Mesenchymal stromal cells lose their immunosuppressive potential after allotransplantation // *Exp. Hematol.* 2008. V. 36. № 10. P. 1370–1376.
- Qadir A.S., Um S., Lee H., Baek K., Seo B.M., Lee G., Kim G.S., Woo K.M., Ryoo H.M., Baek J.H. miR-124 negatively regulates osteogenic differentiation and in vivo bone formation of mesenchymal stem cells // *J. Cell. Biochem.* 2015. V. 116. № 5. P. 730–742.
- Qu D., Li J., Li Y., Khadka A., Zuo Y., Wang H., Liu Y., Cheng L. Ectopic osteochondral formation of biomimetic porous PVA-n-HA/PA6 bilayered scaffold and BMSCs construct in rabbit // *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2011. V. 96. № 1. P. 9–15.
- Samsonraj R.M., Raghunath M., Nurcombe V., Hui J.H., van Wijnen A.J., Cool S.M. Concise review: multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine // *Stem Cells Transl. Med.* 2017. V. 6. № 12. P. 2173–2185.

- Sathy B.N., Daly A., Gonzalez-Fernandez T., Olvera D., Cunniffe G., McCarthy H.O., Dunne N., Jeon O., Alsborg E., Donahue T.L.H., Kelly D.J.* Hypoxia mimicking hydrogels to regulate the fate of transplanted stem cells // *Acta Biomater.* 2019. V. 88. P. 314–324.
- Schofield R.* Standardization of procedures for ectopic marrow grafting: I. Influence of sex of recipient // *Exp. Hematol.* 1986. V. 14. № 1. P. 66–71.
- Scott M.A., Levi B., Askarinam A., Nguyen A., Rackohn T., Ting K., Soo C., James A.W.* Brief review of models of ectopic bone formation // *Stem Cells Dev.* 2012. V. 21. № 5. P. 655–667.
- Sharma S., Sapkota D., Xue Y., Rajthala S., Yassin M.A., Finne-Wistrand A., Mustafa K.* Delivery of VEGFA in bone marrow stromal cells seeded in copolymer scaffold enhances angiogenesis, but is inadequate for osteogenesis as compared with the dual delivery of VEGFA and BMP2 in a subcutaneous mouse model // *Stem Cell Res. Ther.* 2018. V. 9. № 1. P. 23.
- Shatry A.M., Levy R.B.* Engraftment of splenic tissue as a method to investigate repopulation by hematopoietic cells from host and donor marrow // *Stem Cells Dev.* 2004. V. 13. № 4. P. 390–399.
- Shou K., Huang Y., Qi B., Hu X., Ma Z., Lu A., Jian C., Zhang L., Yu A.* Induction of mesenchymal stem cell differentiation in the absence of soluble inducer for cutaneous wound regeneration by a chitin nanofiber-based hydrogel // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2018. V. 12. № 2. P. 867–880.
- Suzuki K., Nagata K., Yokota T., Honda M., Aizawa M.* Histological evaluations of apatite-fiber scaffold cultured with mesenchymal stem cells by implantation at rat subcutaneous tissue // *Biomed. Mater. Eng.* 2017. V. 28. № 1. P. 57–64.
- Trouche E., Girod Fullana S., Mias C., Ceccaldi C., Tortosa F., Seguelas M.H., Calise D., Parini A., Cussac D., Sallerin B.* Evaluation of alginate microspheres for mesenchymal stem cell engraftment on solid organ // *Cell Transplant.* 2010. V. 19. № 12. P. 1623–1633.
- Tsuchiya H., Kitoh H., Sugiura F., Ishiguro N.* Chondrogenesis enhanced by overexpression of sox9 gene in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 301. № 2. P. 338–343.
- Tuček L., Kočí Z., Kárová K., Doležalová H., Suchánek J.* The osteogenic potential of human nondifferentiated and pre-differentiated mesenchymal stem cells combined with an osteoconductive scaffold – early stage healing // *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2017. V. 60. № 1. P. 12–18.
- Ueda T., Fujita A., Ogawa R., Itoh Y., Fukunaga Y., Shimada T., Migita M.* Adipose-derived stromal cells grown on a hydroxyapatite scaffold can support hematopoiesis in regenerated bone marrow in vivo // *Cell Biol. Int.* 2014. V. 38. № 6. P. 790–798.
- Wang Z., Wu D., Zou J., Zhou Q., Liu W., Zhang W., Zhou G., Wang X., Pei G., Cao Y., Zhang Z.Y.* Development of demineralized bone matrix-based implantable and biomimetic microcarrier for stem cell expansion and single-step tissue-engineered bone graft construction // *J. Mater. Chem. B.* 2017. V. 5. № 1. P. 62–73.
- Wang Y., Xiao Y., Long S., Fan Y., Zhang X.* Role of N-cadherin in a niche-mimicking microenvironment for chondrogenesis of mesenchymal stem cells in vitro // *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2020. V. 6. № 6. P. 3491–3501.
- Weigand A., Beier J.P., Schmid R., Knorr T., Kilian D., Götzl R., Gerber T., Horch R.E., Boos A.M.* Bone tissue engineering under xenogeneic-free conditions in a large animal model as a basis for early clinical applicability // *Tissue Eng. Part A.* 2017. V. 23. № 5–6. P. 208–222.
- Wittig O., Diaz-Solano D., Cardier J.* Viability and functionality of mesenchymal stromal cells loaded on collagen microspheres and incorporated into plasma clots for orthopaedic application: Effect of storage conditions // *Injury.* 2018. V. 49. № 6. P. 1052–1057.
- Wu Y., Chen L., Scott P.G., Tredget E.E.* Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis // *Stem Cells.* 2007. V. 25. № 10. P. 2648–2659.
- Yagami K., Shiota T., Shintani S., Mayahara M., Nishizawa M., Yanagisawa S., Sammons R., Kuboki Y.* Honeycomb form  $\beta$ -tricalcium phosphate induces osteogenesis by geometrical property with BMSC // *Biomed. Mater. Eng.* 2011. V. 21. № 5–6. P. 291–306.
- Yagami K., Uyama Y., Yoshizawa Y., Kakuta S., Yamaguchi A., Nagumo M.* A human chondrogenic cell line retains multi-potency that differentiates into osteoblasts and adipocytes // *Bone.* 2004. V. 34. № 4. P. 648–655.
- Yang S.J., Son J.K., Hong S.J., Lee N.E., Shin D.Y., Park S.H., An S.B., Sung Y.C., Park J.B., Yang H.M., Kim S.J.* Ectopic vascularized bone formation by human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells expressing bone morphogenetic factor-2 and endothelial cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. V. 504. № 1. P. 302–308.
- Ye X., Yin X., Yang D., Tan J., Liu G.* Ectopic bone regeneration by human bone marrow mononucleated cells, undifferentiated and osteogenically differentiated bone marrow mesenchymal stem cells in beta-tricalcium phosphate scaffolds // *Tissue Eng. Part C Methods.* 2012. V. 18. № 7. P. 545–556.
- Yu J.H., Shi J.N., Deng Z.H., Zhuang H., Nie X., Wang R.N., Jin Y.* Cell pellets from dental papillae can reexhibit dental morphogenesis and dentinogenesis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 346. № 1. P. 116–124.
- Zhang B., Huo S., Cen X., Pan X., Huang X., Zhao Z.* circAKT3 positively regulates osteogenic differentiation of human dental pulp stromal cells via miR-206/CX43 axis // *Stem Cell Res. Ther.* 2020. V. 11. № 1. P. 531.
- Zheng L., Fan H.S., Sun J., Chen X.N., Wang G., Zhang L., Fan Y.J., Zhang X.D.* Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by collagen-based hydrogel: an *in vivo* study // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2010. V. 93. № 2. P. 783–792.
- Zheng L., Yang J., Fan H., Zhang X.* Material-induced chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells is material-dependent // *Exp. Ther. Med.* 2014. V. 7. № 5. P. 1147–1150.
- Zhu X., Yu F., Yan G., Hu Y., Sun H., Ding L.* Human endometrial perivascular stem cells exhibit a limited potential to regenerate endometrium after xenotransplantation // *Hum. Reprod.* 2021. V. 36. № 1. P. 145–159.

## Experimental Transplantation of Mesenchymal Stromal Cells as an Approach to Studying Their Differentiation *in vivo* (Review)

O. V. Payushina<sup>1, #</sup>, D. A. Tsomartova<sup>1</sup>, Ye. V. Chereshneva<sup>1</sup>, M. Yu. Ivanova<sup>1</sup>, T. A. Lomanovskaya<sup>1</sup>,  
M. S. Pavlova<sup>1</sup>, and S. L. Kuznetsov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation  
(Sechenov University), 8-2 Trubetskaya str., Moscow, 119991 Russia*

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

Mesenchymal stromal cells (MSCs) are currently under active investigation. Knowledge about the *in vivo* differentiation potencies of MSCs obtained in experiments on their transplantation to laboratory animals is necessary for a better understanding of the biology of these cells and their effective clinical application. MSCs can be transplanted into a tissue defect or into the systemic circulation; however, for many research purposes, their ectopic transplantation under the skin, under the kidney capsule, or using diffusion chambers is preferable. The review considers the scope of these methods of MSC transplantation, analyzes their advantages and disadvantages, and systematizes the experimental data obtained with them.

*Keywords:* mesenchymal stromal cells, transplantation, differentiation, experimental models, scaffolds, diffusion chambers

УДК 577.21

## ЭКСПРЕССИЯ МАТРИЧНЫХ РНК ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ GATA3, FOXP3, TBX21, STAT3, NFKB1, MAPK8 У ЧЕЛОВЕКА И ИХ КООПЕРАТИВНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ХРОНИЧЕСКОГО РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

© 2022 г. В. С. Никифоров\*, \*\*, @, А. В. Аклеев\*, \*\*

\*ФГБУН “Уральский научно-практический центр радиационной медицины” ФМБА,  
ул. Воровского, д. 68, корп. А, Челябинск, 454048 Россия\*\*ФГБОУВО “Челябинский государственный университет”,  
ул. Братьев Кашириных, д. 129, Челябинск, 454001 Россия@E-mail: [nikiforovx@mail.ru](mailto:nikiforovx@mail.ru)

Поступила в редакцию 20.04.2022 г.

После доработки 05.05.2022 г.

Принята к публикации 16.05.2022 г.

Представлены результаты оценки экспрессии мРНК транскрипционных факторов GATA3, FOXP3, TBX21, STAT3, NFKB1 и MAPK8 в клетках периферической крови у 264 жителей прибрежных сел реки Течи Челябинской и Курганской областей, которые в 1950-х гг. подверглись хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию. Диапазон индивидуальных значений дозы облучения красного костного мозга за счет внешнего гамма-излучения и  $^{90}\text{Sr}$  составил 77.8–3507.1 мГр, среднее значение –  $706.3 \pm 46.3$  мГр. Установлено, что в отдаленные сроки после хронического облучения на молекулярном уровне происходят изменения в транскрипционном ответе клетки. Отмечена модификация экспрессии иммунорегуляторных генов *NFKB1* и *MAPK8* в клетках периферической крови облученных людей. Сравнительный анализ взаимодействия исследуемых мРНК продемонстрировал наличие связи генов *MAPK8* и *NFKB1* в группе хронически облученных лиц. Полученные результаты могут свидетельствовать о вовлеченности этих транскрипционных факторов в нарушение иммунного ответа у облученного населения.

**Ключевые слова:** экспрессия генов, транскрипционный фактор, хроническое радиационное воздействие, малые дозы, река Теча

DOI: 10.31857/S1026347022060105

Большинство клеточных процессов, определяющих генетический гомеостаз организма, а также надежность хранения и передачи наследственной информации после облучения, генетически детерминированы. При изучении ответа клеток на действие малых доз ионизирующего излучения (преимущественно с низкой мощностью дозы), наблюдается изменение экспрессии ряда генов, в том числе транскрипционных факторов, вовлеченных в сигнальные пути, направленные на регуляцию функций субпопуляций лимфоцитов, секрецию цитокинов и хемокинов, что позволяет экспонированным клеткам и тканям восстанавливать генетический гомеостаз (Amundson *et al.*, 2003). Так, облучение в диапазоне малых доз способствует изменению уровня транскрипции ключевых белков (p105, JNK1, p38 MAPK, Lck, ZAP70), участвующих в трансдукции сигнала CD4+-лим-

фоцитов, и изменению экспрессии генов, регулирующих иммунный ответ (Rizvi *et al.*, 2011).

В Челябинской и Курганской областях у облученных жителей прибрежных сел реки Течи описаны некоторые изменения иммунитета в период реализации отдаленных медицинских последствий. У данной категории лиц отмечается пониженное количество лейкоцитов в крови за счет снижения содержания нейтрофилов и лимфоцитов, пониженные показатели интенсивности внутриклеточного кислородзависимого метаболизма моноцитов, активация лизосомальной активности нейтрофилов и воспалительные изменения цитокинового спектра сыворотки крови, в частности снижение содержания ИЛ-4 и повышение уровней ФНО $\alpha$  и ИФН $\gamma$  (Аклеев, 2020).

В некоторых случаях изменение паттерна экспрессии генов вовлечено в патогенез отдаленных

радиационных эффектов, таких как злокачественные новообразования и изменение иммунного статуса у облученных людей (Шуленина и др., 2012). Показано, что хроническое радиационное воздействие в диапазоне малых доз в отдаленные сроки приводит к модификации экспрессии транскрипционного фактора NFκB1, сопровождающейся усилением экспрессии ИЛ-1 и ИЛ-6 (Hosoi *et al.*, 2001). Повышенное содержание мРНК генов семейства *NFKB* (*NFKB1*, *NF-κB2* и *Rel*), а также генов, регулирующих пролиферацию и дифференцировку иммунокомпетентных клеток, наблюдалось в отдаленные сроки (спустя более 20 лет) у лиц с раком предстательной железы (Savli *et al.*, 2008), щитовидной железы (Cine *et al.*, 2012), и лейкозом (Savli *et al.*, 2012), облученных вследствие аварии на ЧАЭС. В работе (Albanese *et al.*, 2007.) говорится об изменении активности 116 генов цитокинов и репарации спустя 11–12 лет у людей, облученных в диапазоне накопленных доз от 0.18 до 49.0 мГр. Детальное описание картины полученных изменений свидетельствовало о смещении иммунного баланса в сторону воспалительных реакций у данной категории людей в отдаленные сроки.

Поскольку вызванные радиационно-индуцированные изменения в системе клеточного гомеостаза могут сохраняться в течение длительного времени после облучения, целью настоящей работы явилась оценка экспрессии транскрипционных факторов, участвующих в регуляции системного иммунитета у хронически облученных жителей прибрежных сел реки Течи в период реализации отдаленных соматико-стохастических эффектов радиационного воздействия.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили образцы периферической крови от 264 жителей прибрежных сел реки Течи, подвергшихся хроническому радиационному воздействию вследствие сбросов жидких радиоактивных отходов (ЖРО) ПО “Маяк”. Внутреннее облучение формировалось за счет радионуклидов, поступивших в организм с речной водой и продуктами местного производства, внешнее  $\gamma$ -излучение было сформировано за счет загрязнения радионуклидами донных отложений и пойменных почв. В качестве основных дозиметрических величин, определяющих меры воздействия ИИ на организм обследованных лиц, являлись дозы облучения ККМ, тимуса и периферических лимфоидных органов.

Массированные сбросы радиоактивных отходов начались в 1950 г., и в первые годы основными

источниками облучения были короткоживущие радионуклиды. Затем в результате защитных мероприятий и распада короткоживущих радионуклидов мощность дозы внешнего облучения, а также внутреннего облучения мягких тканей существенно снизилась и после 1960 г. не превышала  $10^{-5}$  Гр/год для всех, кто проживал на прибрежных территориях. Несколько иная картина облучения была у красного костного мозга, поскольку главный вклад в формирование дозы вносил долгоживущий остеотропный  $^{90}\text{Sr}$ , обеспечивающий хроническое облучение с монотонно снижающейся мощностью дозы, которая к 1985 г. у всех облученных была менее  $10^{-5}$  Гр/год (Degteva *et al.*, 2019).

Из исследования были исключены лица: а) в период острых или обострения хронических воспалительных заболеваний; б) имеющие онкологические и аутоиммунные заболевания; в) принимающие во время обследования антибиотики, гормональные и цитостатические препараты; г) имевшие контакт с генотоксичными агентами в процессе профессиональной деятельности.

На основании сформулированных критериев были выделены две основные группы обследуемых людей:

1. Группа облученных лиц с индивидуальными накопленными дозами облучения ККМ более 70 мГр.

2. Группа сравнения – лица, проживающие в сходных социально-экономических условиях, но с накопленной дозой облучения ККМ, не превышающей 70 мГр за весь период жизни (условный внутренний контроль).

Исследование экспрессии транскрипционных факторов у облученных людей проводили в отдаленные сроки от начала хронического радиационного воздействия (спустя более 60 лет). Группа хронически облученных лиц составила 168 человек, в группу сравнения вошло 96 человек. В табл. 1 представлена характеристика обследуемых групп.

Среднее значение возраста для хронически облученных лиц составило  $71.04 \pm 0.43$  год (диапазон: 60–87 лет), для группы сравнения –  $66.45 \pm 0.70$  лет (диапазон: 60–87 лет). В двух группах подавляющее большинство образцов крови было получено от женщин. Обследуемые группы состояли из лиц, принадлежавших к двум этническим группам: славяне (в основном русские, а также украинцы и белорусы) и тюрки (в основном татары и башкиры).

Средняя накопленная доза облучения ККМ у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, составила  $706.3 \pm 46.3$  мГр (диапазон: 77.8–3507.1 мГр). Средняя накопленная доза облучения тимуса и периферических лимфоидных

Таблица 1. Характеристика обследованных групп

| Характеристика групп   |         | Облученные лица                   | Группа сравнения              |
|--|---------|-----------------------------------|-------------------------------|
|  |         | 168                               | 96                            |
| Возраст на момент обследования, лет: $M \pm SE$ (min–max)  |         | 71.0 $\pm$ 0.4<br>(60.0–87.0)     | 66.4 $\pm$ 0.7<br>(60.0–87.0) |
| Пол, $n$ (%)   | Мужчины | 62 (37)                           | 33 (34)                       |
|  | Женщины | 106 (63)                          | 63 (66)                       |
| Накопленные дозы облучения КKM, мГр: $M \pm SE$ (min–max)  |         | 706.3 $\pm$ 46.3<br>(77.8–3507.1) | 18.8 $\pm$ 1.7<br>(0.0–67.5)  |
| Мощность дозы облучения КKM в период максимального воздействия, мГр/год: $M \pm SE$ (min–max)  |         | 131.3 $\pm$ 10.0<br>(2.3–719.2)   | 0.62 $\pm$ 0.2<br>(0.0–9.5)   |
| Накопленные дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов, мГр: $M \pm SE$ (min–max)                                     |         | 92.2 $\pm$ 7.9<br>(2.8–644.88)    | 7.1 $\pm$ 0.9<br>(0.0–33.57)  |
| Мощность дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов в период максимального воздействия, мГр/год: $M \pm SE$ (min–max) |         | 38.47 $\pm$ 3.8<br>(0.3–321.0)    | 0.31 $\pm$ 0.1<br>(0.0–6.4)   |

органов составила  $131.3 \pm 10.0$  мГр (диапазон: 2.3–719.2 мГр). Максимальное значение мощности дозы облучения КKM было получено людьми в период повышенного радиационного воздействия (1950–1951 гг.). Среднее значение мощности дозы облучения КKM в период максимального воздействия в группе хронически облученных людей составило  $131.3 \pm 10.0$  мГр/год (диапазон: 2.3–719.2 мГр/год), среднее значение мощности дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов в период максимального воздействия составило  $38.5 \pm 3.8$  мГр/год (диапазон: 0.3–321.0 мГр/год). Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие на проведение исследования, одобренное этическим комитетом УНПЦ РМ ФМБА России.

Материалом для исследования служили образцы периферической крови, собранные в стерильные вакуумные пробирки Tempus Blood RNA Collection Tubes (“Applied Biosystem”, США), содержащие транспортную среду для стабилизации РНК в биопробах. Взятие крови осуществлялось из локтевой вены утром натощак.

Выделение РНК проводили на колонках с помощью набора GeneJET Stabilized and Fresh Whole Blood RNA Kit (Thermo Scientific™, США) по стандартной методике. Информацию о концентрации и чистоте выделенных образцов РНК получали с помощью спектрофотометра NanoDrop

2000С (Thermo Scientific, США). Отношение оптических плотностей, измеренных при А260/280 для РНК, выделенной из всех образцов крови, составило  $2.0 \pm 0.05$ . Исходным количеством для анализа было 100 нг/мкл РНК каждого образца. Реакцию обратной транскрипции для синтеза кДНК проводили с использованием коммерческого набора реагентов High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, США). Относительное количественное содержания мРНК определяли с помощью ПЦР в режиме реального времени с использованием амплификатора CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, USA).

Количественную оценку экспрессии анализируемых генов проводили по методу  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak *et al.*, 2001). Данные оценивали относительно уровней мРНК генов “домашнего хозяйства” (housekeeping genes) *COMT* и *B<sub>2</sub>M*. Анализ кривых амплификации производили в программе Bio-Rad CFX Manager 2.1 (Bio-Rad Laboratories, США) методом пороговой линии. Расчет проводился с учетом трех повторов для каждого гена и эффективности амплификации, которая была получена путем построения калибровочных кривых. В работе были использованы коммерческие наборы праймеров/зондов от Applied Biosystems, США: *STAT3* (Hs00374280\_m1), *GATA3* (Hs00231122\_m1), *MAPK8* (Hs01548508\_m1), *NFKB1* (Hs00765730\_m1), *FOXP3* (Hs01085834\_m1) и *TBX21* (Hs00894392\_m1).

Статистический анализ данных исследования проводили с применением стандартных методов математико-статистической обработки с использованием пакетов программ прикладного статистического анализа (Statistica v. 10.0 и SigmaPlot). Для оценки межгрупповых различий значений признаков применяли *U*-критерий Манна–Уитни. Определение вида зависимости экспрессии транскрипционных факторов от дозовых характеристик у облученных людей проводилось с использованием корреляционного и регрессионного анализа. Для всех критериев и тестов различия признавали статистически значимыми при  $p < 0.05$ . При  $0.05 < p < 0.1$  различие рассматривали как тенденцию к значимому различию и необходимости увеличения числа наблюдений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

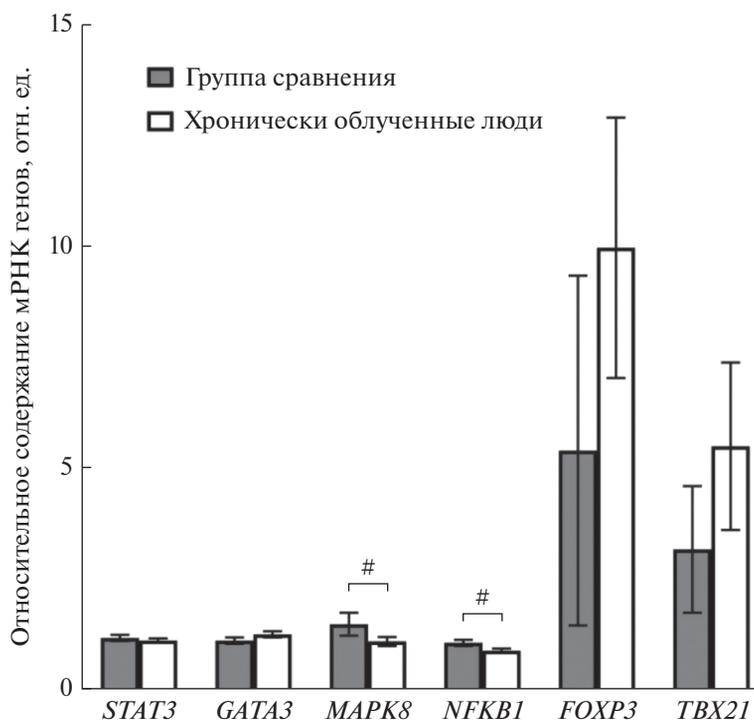
Результаты определения экспрессии мРНК иммунорегуляторных генов *GATA3*, *FOXP3*, *TBX21*, *STAT3*, *NFKB1*, *MAPK8* в клетках периферической крови обследованных групп продемонстрированы на рис. 1.

Обращает на себя внимание, что в группе хронически облученных лиц относительно группы сравнения статистически значимо снижена экс-

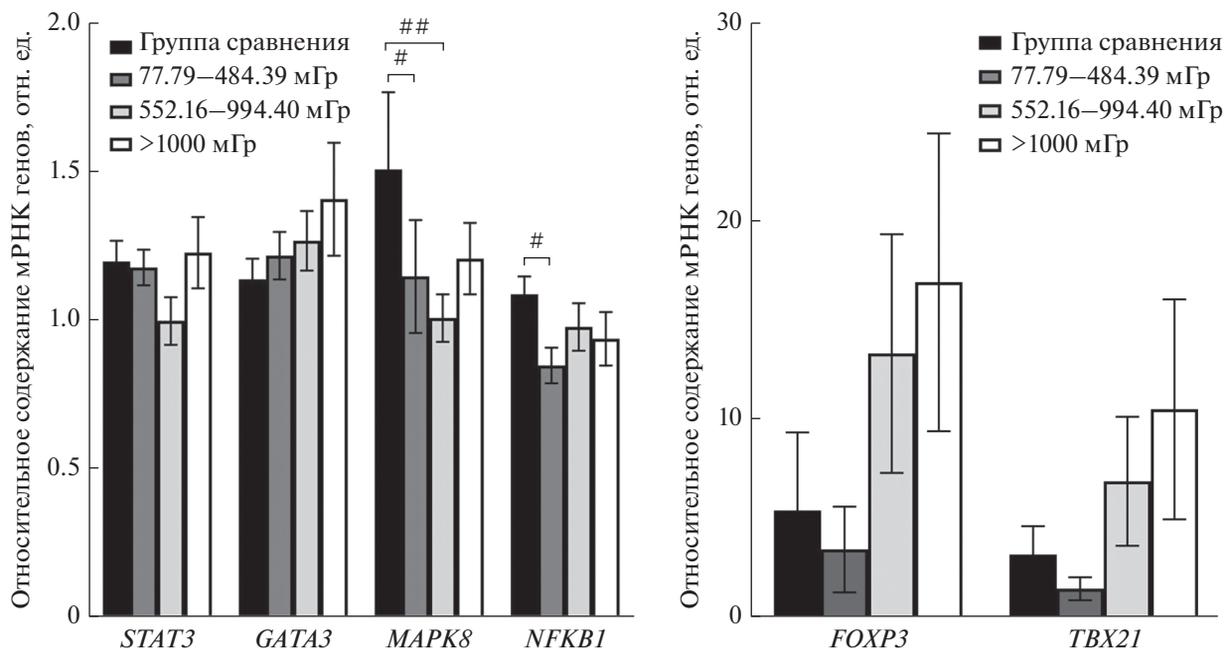
прессия транскрипционных факторов *MAPK8* ( $1.51 \pm 0.26$  отн. ед. против  $1.12 \pm 0.10$  отн. ед., при  $p = 0.01$ ) и *NFKB1* ( $1.10 \pm 0.07$  отн. ед. против  $0.91 \pm 0.04$  отн. ед., при  $p = 0.02$ ).

Кроме того в группе хронически облученных людей отмечена тенденция к увеличению относительного содержания мРНК генов *FOXP3* ( $5.43 \pm 3.95$  отн. ед. против  $10.01 \pm 2.94$  отн. ед.) и *TBX21* ( $3.21 \pm 1.43$  отн. ед. против  $5.53 \pm 1.89$  отн. ед.), однако в силу высокой степени вариабельности данных и как следствие большой стандартной ошибки средней, статистически значимых различий не обнаружено.

Поскольку кумулятивные дозы облучения у хронически облученных людей находились в достаточно широком диапазоне значений, представляло интерес оценить экспрессию мРНК исследуемых генов в зависимости от величины поглощенных дозы облучения ККМ. С этой целью обследованные лица были условно поделены на три дозовые подгруппы (облученные в диапазоне промежуточных значений доз: 1 группа: 77.8–484.4 мГр (80 человек), 2 группа: 522.6–994.4 мГр (50 человек) и облученные в диапазоне высоких значений доз: 3 группа: >1000 мГр (диапазон от 1032.1 до 3507.1 мГр) (38 человек).



**Рис. 1.** Экспрессия генов *GATA3*, *FOXP3*, *TBX21*, *STAT3*, *NFKB1*, *MAPK8* в группе сравнения и группе хронически облученных лиц (среднее и ошибка среднего). # — достоверные различия в экспрессии генов между группой сравнения и хронически облученными лицами.



**Рис. 2.** Экспрессия генов *GATA3*, *FOXP3*, *TBX21*, *STAT3*, *NFKB1*, *MAPK8* в дозовых подгруппах облученных лиц (среднее и ошибка среднего). # – достоверные различия в экспрессии генов между группой сравнения и хронически облученными лицами (дозы облучения ККМ 77.79–484.39 мГр); ## – достоверные различия в экспрессии генов между группой сравнения и хронически облученными лицами (дозы облучения ККМ 522.16–994.40 мГр).

Данные, представленные на рис. 2, демонстрируют статистически значимое низкое относительное содержание мРНК гена *MAPK8* у хронически облученных людей, чьи накопленные дозы облучения ККМ находились в диапазоне промежуточных значений доз 77.8–484.4 мГр ( $p = 0.08$ ) и 522.2–994.4 мГр ( $p = 0.03$ ) при сопоставлении показателей с группой сравнения.

Что касается результатов, полученных для гена *NFKB1*, экспрессия которого была снижена в общей выборке хронически облученных лиц, то статистически значимые различия были получены только между группой сравнения и подгруппой лиц, облученных в диапазоне доз 77.8–484.4 мГр ( $p = 0.02$ ).

Таким образом, различия в показателях транскрипционной активности вышеуказанных генов между сравниваемыми группами преимущественно были отмечены для лиц, чьи накопленные дозы облучения ККМ находились в диапазоне промежуточных значений.

Согласно данным, представленным в табл. 2, не было отмечено статистически значимых корреляционных связей между относительным содержанием мРНК иммунорегуляторных генов *GATA3*, *STAT3*, *MAPK8*, *NFKB1*, *FOXP3* и *TBX21* от величин накопленных доз облучения ККМ, тимуса и периферических лимфоидных органов, а также от

величин мощностей доз облучения ККМ, тимуса и периферических лимфоидных органов в период максимального радиационного воздействия. Тем не менее, на уровне тенденции отмечена положительная связь, демонстрирующая увеличение экспрессии мРНК гена *GATA3* от дозы облучения ККМ ( $p = 0.06$ ) и тимуса и периферических лимфоидных органов ( $p = 0.07$ ).

В настоящее время доказана активация некоторых внутриклеточных сигнальных каскадов, вовлеченных в регуляцию иммунной системы, после радиационного воздействия (Аклеев и др., 2019). В рамках данной работы, методом корреляционного анализа была проведена оценка взаимосвязи транскрипционной активности исследуемых генов у людей, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, и в группе сравнения.

Результаты, представленные в виде корреляционных матриц (рис. 3, 4), свидетельствуют о наличии слабых положительных связей в двух выборках между экспрессией мРНК генов *SATA3* и *GATA3* (в группе сравнения ( $R = 0.28$ ,  $p = 0.005$ ); в группе хронически облученных людей ( $R = 0.17$ ,  $p = 0.02$ )) и экспрессией мРНК генов *GATA3* и *NFKB1* (в группе сравнения ( $R = 0.27$ ,  $p = 0.008$ ); в группе хронически облученных людей ( $R = 0.19$ ,  $p = 0.01$ )).

**Таблица 2.** Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена ( $R$ ) между относительным содержанием мРНК исследуемых генов и величинами доз и мощности доз в период максимального воздействия

| Ген          | Доза облучения<br>ККМ, мГр | Мощность дозы<br>облучения ККМ<br>в период максимального<br>воздействия, мГр/год | Доза облучения тимуса<br>и периферических<br>лимфоидных органов,<br>мГр/год | Мощность дозы<br>облучения тимуса<br>и периферических<br>лимфоидных органов<br>в период максимального<br>воздействия, мГр/год |
|--------------|----------------------------|--|---|---|
|              | $R(p)$                     |  |   |   |
| <i>STAT3</i> | -0.07<br>(0.28)            | 0.04<br>(0.65)   | -0.001<br>(0.98)  | 0.06<br>(0.47)  |
| <i>GATA3</i> | 0.11<br>(0.06)             | 0.001<br>(0.98)  | 0.11<br>(0.07)  | 0.05<br>(0.56)  |
| <i>MAPK8</i> | -0.09<br>(0.14)            | -0.09<br>(0.16)  | 0.05<br>(0.54)  | 0.01<br>(0.91)  |
| <i>NFKB1</i> | -0.05<br>(0.51)            | 0.09<br>(0.27)   | -0.016<br>(0.80)  | 0.12<br>(0.15)  |
| <i>FOXP3</i> | 0.14<br>(0.17)             | 0.22<br>(0.10)   | 0.06<br>(0.54)  | 0.11<br>(0.38)  |
| <i>TBX21</i> | 0.05<br>(0.65)             | 0.22<br>(0.10)   | 0.05<br>(0.68)  | 0.17<br>(0.19)  |

Примечание.  $R(p)$  — коэффициент корреляции (доверительная вероятность значимости корреляционной связи).

Кроме того в двух исследуемых выборках отмечена сильная положительная корреляционная связь между экспрессией мРНК генов *FOXP3* и *TBX21* (в группе сравнения ( $R = 0.63$ ,  $p = 0.0001$ ); в группе хронически облученных людей ( $R = 0.78$ ,  $p = 0.0001$ )). Отличительной особенностью группы сравнения являлась умеренная положительная корреляционная связь между экспрессией мРНК генов *FOXP3* и *NFKB1* в группе сравнения ( $R = 0.40$ ,  $p = 0.02$ ). В то время как в группе хронически облученных людей были зарегистрированы слабая обратная связь между экспрессией мРНК генов *FOXP3* и *STAT3* ( $R = -0.26$ ,  $p = 0.02$ ) и слабая прямая связь между экспрессией мРНК генов *NFKB1* и *MAPK8* ( $R = 0.22$ ,  $p = 0.02$ ).

Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что хроническое радиационное воздействие с преимущественным облучением ККМ человека может длительно модифицировать транскрипционную активность иммунорегуляторных генов *MAPK8* и *NFKB1*.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хорошо доказано, что ионизирующее излучение способно модулировать экспрессию генов, продукты которых координируют общий клеточный ответ на стресс, включая иммунный ответ (Fachin *et al.*, 2009, Morandi *et al.*, 2009). В свою очередь aberrантная активность гомеостатических генов может служить первостепенной причиной развития как ранних, так и отдаленных эффектов облучения.

Исследование по оценке экспрессии мРНК иммунорегуляторных генов было проведено у хронически облученных жителей прибрежных сел реки Течи (Челябинская и Курганская области) в отдаленные сроки. Показано, что даже через столь удаленный период после начала радиационного воздействия наблюдаются статистически значимые сдвиги в функциональном состоянии транскриптома у данной когорты лиц.

Результаты нашего исследования показали, что в период реализации отдаленных последствий

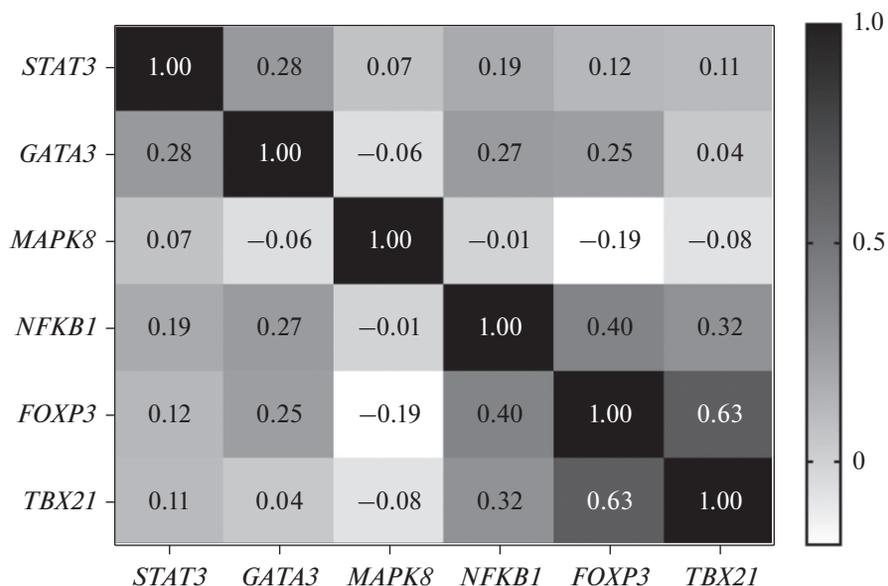


Рис. 3. Матрица парных коэффициентов корреляции экспрессии мРНК исследуемых генов в клетках периферической крови у лиц, составляющих группу сравнения.

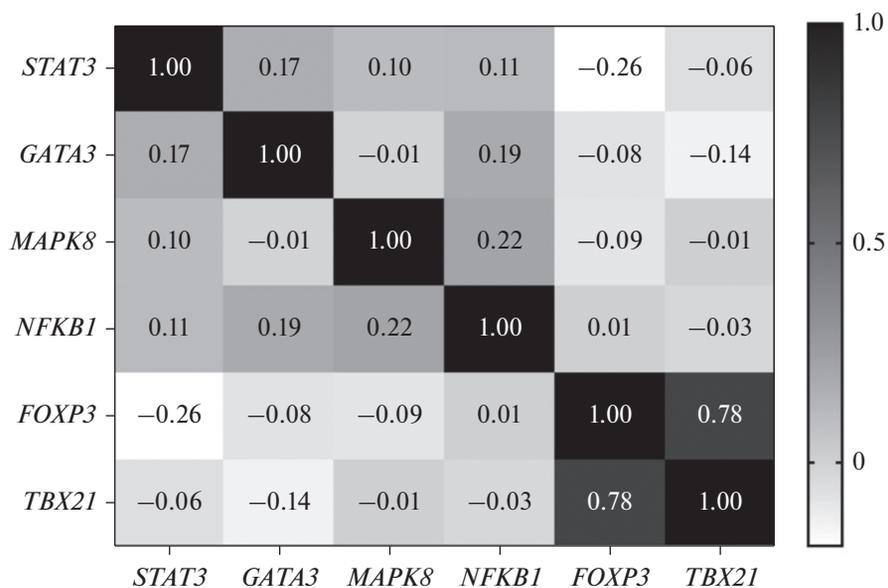


Рис. 4. Матрица парных коэффициентов корреляции экспрессии мРНК исследуемых генов в клетках периферической крови у хронически облученных людей.

(злокачественные новообразования, лейкозы и заболевания сердечно-сосудистой системы) после хронического радиационного воздействия с преимущественным облучением КKM у жителей прибрежных сел реки Течи отмечено статистически значимое снижение экспрессии мРНК транскрипционных факторов *NFKB1* и *MAPK8* относительно

внутреннего контроля (людей, дозы облучения КKM у которых не превышали 70 мГр).

Очевидно, что пострадиационные изменения транскрипционной активности генов *NFKB1* и *MAPK8* у хронически облученных лиц могут оказывать влияние на состояние иммунитета и клеточного гомеостаза.

Ген *NFKB1* кодирует одноименный транскрипционный фактор *NFKB1*, который является регулятором транскрипции генов иммунного ответа. В частности, попадая в ядро клетки, этот транскрипционный фактор модулирует экспрессию генов, кодирующих антигенные рецепторы на иммунных клетках, молекулы клеточной адгезии, провоспалительных цитокинов (TNF, IL1, LPS) и хемоаттрактантов (MCP-1) (Cartwright *et al.*, 2016). Кроме этого, *NFKB1* контролирует экспрессию ряда генов, вовлеченных в широкий спектр биологических функций клетки. В ряде сообщений говорится, что после острого облучения *NFKB1* способен оказывать влияние на транскрипцию генов, кодирующих апоптотические белки семейства *BCL-2*, таких как *BCL-XL*, *BFL-1/A1*, *Nr13*, *BAX* и *BCL-2*, тем самым блокировать инициацию апоптоза (Chen *et al.*, 2002). Однако снижение экспрессии мРНК *NFKB1*, которое мы отмечаем у облученных лиц в данной работе, по сути, должно приводить к противоположному эффекту.

Это косвенно может подтвердить данные наших предыдущих работ, в которых мы демонстрируем достоверное изменение транскрипционной активности апоптотических генов *BAX* и *BCL-2*, приводящее к смещению баланса клеточного гомеостаза в сторону индукции процесса апоптоза в мононуклеарных клетках периферической крови у облученных людей (Никифоров и др. 2020).

Полученные результаты в очередной раз подтверждают идею о том, что характер изменений на молекулярном уровне напрямую зависит от характера облучения и величины дозы воздействия. Так, облучение с низкой мощностью дозы приводит к отличной от острого радиационного воздействия модели генной экспрессии.

МАРК8, экспрессия которого также была достоверно понижена в группе облученных людей, является субстратом для многих клеточных процессов, в частности пролиферации и развитии иммунокомпетентных клеток. В Т-лимфоцитах МАРК8 играет ключевую роль в дифференцировке Т-хелперов в Т-хелперы 1 (Th1) (Dent *et al.*, 2003). Немаловажную роль этот транскрипционный фактор также оказывает на процесс апоптоза, способствует активной его инициации в клетках, находящихся в состоянии стресса, за счет фосфорилирования ключевых факторов регуляции, включая p53 (Yue *et al.*, 2020).

Не для всех исследованных иммунорегуляторных генов были продемонстрированы транскрипционные ответы на хроническое радиационное воздействие. Статистически значимых отклонений в

экспрессии генов, кодирующих белки Stat3 (фактор роста и развития иммунокомпетентных клеток), Gata3 (фактор воспалительных и гуморальных иммунных реакций, регулятор развития Т-клеточного звена), Foxp3 (регулятор развития и функционирования регуляторных Т-клеток), Tbx21 (фактор активации пролиферации Т-хелперов 1 типа) у хронически облученных людей по отношению к группе сравнения выявлено не было.

Тем не менее, отмечены тенденции к увеличению экспрессии мРНК генов *TBX21* и *FOXP3* в группе хронически облученных людей, и положительная корреляция связь между экспрессией мРНК гена *GATA3* и дозами облучения ККМ, тимуса и периферических лимфоидных органов. Данные предварительные, необходимо продолжать исследование с расширенными выборками обследованных лиц, для уточнения значимости вышеуказанных факторов в развитии отдаленных эффектов облучения.

В зависимости от радиационных факторов, таких как мощность и доза излучения, изменению подвергаются определенные сигнальные каскады, которые способны модифицировать функции клеток иммунной системы у человека (Azimian *et al.*, 2015). Однако до настоящего времени сигнальные пути, которые вовлечены в иммунный ответ на действие хронического низкоинтенсивного радиационного воздействия, остаются мало изученными.

Интерес представляют данные по исследованию кооперативных взаимодействий генов. Помимо связей, которые были зафиксированы в двух исследуемых выборках, отмечены соотношения, характерные только для группы облученных людей. В частности положительная слабая корреляция между экспрессией ранее упомянутых мРНК генов *МАРК8* и *NFKB1*.

Как было сказано ранее, продукты этих генов осуществляют регуляцию иммунного ответа через контроль процессов пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток. Кроме того, согласно данным литературы оба этих гена являются ключевыми активаторами сигнальных путей, участвующих в воспалительных реакциях (Loza *et al.*, 2007). Помимо продукции провоспалительных цитокинов (ФНО-а, IL-6 и др.), эти транскрипционные факторы контролируют экспрессию генов хемоаттрактантов макрофагов, нейтрофилов и Т-клеток (Dent *et al.*, 2003). Однако вовлеченность *МАРК8* и *NFKB1* в патогенез воспалительных реакций у облученных людей в отдаленные сроки требует дополнительного изучения.

Таким образом, в отдаленные сроки у жителей прибрежных сел реки Течи, подвергшихся многолетнему радиационному воздействию с преимущественным облучением красного костного мозга (максимальные поглощенные дозы достигали 3507.1 мГр), отмечены особенности экспрессии транскрипционных факторов MAPK8 и NFKB1, участвующих в регуляции системного иммунитета человека. Принимая во внимание важность экспрессии этих транскрипционных факторов в поддержании генетического гомеостаза иммунокомпетентных клеток, можно полагать, что изменения в регуляции системного иммунитета у облученных людей в отдаленные сроки могут быть опосредованы модификацией их транскрипционной активности.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аклеев А.А. Иммунный статус человека в отдаленном периоде хронического радиационного воздействия // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020. Т. 65. № 4. С. 29–36.
- Аклеев А.А., Никифоров В.С., Блинова Е.А., Долгушин И.И. Экспрессия генов иммунного ответа у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, в отдаленные сроки // Российский иммунологический журнал. 2019. № 2. С. 1042–1044.
- Никифоров В.С., Блинова Е.А., Аклеев А.В. Транскрипционная активность генов клеточного цикла и апоптоза у хронически облученных лиц, имеющих повышенную частоту TCR-мутантных лимфоцитов // Радиация и риск (Бюллетень национального радиационно-эпидемиологического регистра). 2020. № 2. С. 89–100.
- Шуленина Л.В., Ушенкова Л.Н., Ледин Е.В., Шагирова Ж.М., Раева Н.Ф., Засухина Г.Д., Михайлов В.Ф. Экспрессия генов *P53*, *NPM1*, *Kras*, *c-Myc*, *P14<sup>ARF</sup>* в крови онкологических больных до и после лучевой терапии // Радиационная биология. Радиоэкология. 2012. № 6. С. 572–581.
- Albanese J., Martens K., Karanitsa L.V., Schreyer S.K., Dainiak N. Multivariate analysis of low-dose radiation-associated changes in cytokine gene expression profiles using microarray technology // Exp. Hematol. 2007. V. 35. № 4. P. 47–54.
- Amundson S.A., Lee R.A., Koch-Paiz C.A., Bittner M.L., Meltzer P., Trent J.M., Jr. Fornace A.J. Differential responses of stress genes to low dose-rate gamma irradiation // Mol. Cancer Res. 2003. V. 1. № 6. P. 445–452.
- Azimian H., Bahreyni-Toossi M.T., Rezaei A.R. Up-regulation of Bcl-2 expression in cultured human lymphocytes after exposure to low doses of gamma radiation // J. Med. Phys. 2015. V. 40. № 1. P. 38–44.
- Cartwright T., Perkins N.D., Wilson C.L. NFKB1: a suppressor of inflammation, ageing and cancer // FEBS J. 2016. V. 283. № 10. P. 1812–1822.
- Cine N., Tarkun I., Canturk N., Gunduz Y., Sunnetci D., Savli H. Whole genome expression, canonical pathway and gene network analysis in the cases of papillary thyroid cancer // Eur. Soc. Human Genet. Confer. Proc. 2012. V. 20. № 1. P. 192.
- Chen X., Shen B., Xia L., Khaletzkii A., Chu D., Wong J.Y., Li J.J. Activation of nuclear factor kappaB in radioreistance of TP53-inactive human keratinocytes // Cancer Res. 2002. V. 62. № 4. P. 1213–1221.
- Degteva M., Napier B., Tolstykh E., Shiskina E., Bougrov N., Krestinina L., Akleev A. Individual dose distribution in cohort of people exposed as a result of radioactive contamination of the Techa river // Med. Rad. Rad. Safety. 2019. V. 64. № 3. P. 46–53.
- Dent P., Yacoub A., Fisher P.B., Hagan M.P., Grant S. MAPK pathways in radiation responses // Oncogene. 2003. V. 22. № 37. P. 5885–5896.
- Fachin A.L., Mello S.S., Sandrin-Garcia P., Junta C.M., Ghilardi-Netto T., Donadi E.A., Passos G.A., Sakamoto-Hojo E.T. Gene expression profiles in radiation workers occupationally exposed to ionizing radiation // J. Radiat Res. 2009. V. 50. № 1. P. 61–71.
- Hosoi Y., Miyachi H., Matsumoto Y., Enomoto A., Nakagawa K., Suzuki N., Ono T. Induction of interleukin-1beta and interleukin-6 mRNA by low doses of ionizing radiation in macrophages // Int. J. Cancer. 2001. V. 96. № 5. P. 270–276.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method // Methods. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408.
- Loza M.J., McCall C.E., Li L., Isaacs W.B., Xu J., Chang B.L. Assembly of inflammation-related genes for pathway-focused genetic analysis // PLoS One. 2007. V. 10. № 2. e1035.
- Morandi E., Severini C., Quercioli D., Perdichizzi S., Mascolo M.G., Horn W., Vaccari M., Nucci M.C., Lodi V., Violante F.S., Bolognesi C., Grilli S., Silingardi P., Colacci A. Gene expression changes in medical workers exposed to radiation // Radiat. Res. 2009. V. 172. № 4. P. 500–508.
- Rizvi A., Pecaat M.J., Slater J.M., Subramaniam S., Gridley D.S. Low-dose gamma-rays modify CD4(+) T cell signalling response to simulated solar particle event protons in a mouse model // Int. J. Radiat Biol. 2011. V. 87. № 1. P. 24–35.
- Savli H., Szendrői A., Romics I., Nagy B. Gene network and canonical pathway analysis in prostate cancer: a microarray study // Exp. Mol. Med. 2008. V. 40. № 2. P. 176–185.
- Savli H., Sunnetci D., Cine N., Gluzman D.F., Zavelevich M.P., Sklyarenko L.M., Nadgornaya V.A., Koval S.V. Gene expression profiling of B-CLL in Ukrainian patients in post-Chernobyl period // Exp. Oncol. 2012. V. 34. № 1. P. 57–63.
- Yue J., Lopez J.M. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 7. P. 2346.

## Expression of Messenger RNA of Transcription Factors GATA 3, FOXP3, TBX21, STAT3, NFKB1, MAPK8 in Humans and Their Cooperative Interactions in the Long Term after Chronic Radiation Exposure

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

<sup>1</sup> Ural Research Center for Radiation Medicine, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Russian Federation, 68A, Vorovsky street, Chelyabinsk, 454048 Russia

<sup>2</sup> Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Br. Kashirinykh st.129, 454001 Russia

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

The results of evaluation of mRNA expression of transcription factors GATA3, FOXP3, TBX21, STAT3, NFKB1 and MAPK8 in peripheral blood cells in 264 residents of the Techa Riverside villages of the Chelyabinsk and Kurgan regions, who were exposed to chronic low dose-rate radiation exposure in the 1950s are presented. The range of individual values of red bone marrow dose due to external gamma exposure and 90Sr was 77.8–3507.1 mGy, the average value was  $706.3 \pm 46.3$  mGy. It was found that changes in the transcriptional response of the cell occur at the molecular level long term after chronic radiation exposure. Modification of expression of immunoregulatory genes *NFKB1* and *MAPK8* in the peripheral blood cells of exposed people was noted. A comparative analysis of the interaction of the studied mRNAs demonstrated the presence of a link between *MAPK8* and *NFKB1* genes in a group of chronically exposed individuals. The obtained results may indicate the involvement of these transcription factors in the violation of the immune response in the exposed population.

**Keywords:** gene expression, transcription factor, chronic radiation exposure, low doses, Techa River

УДК 57.017.5:581.3:582.47

## РЕГЕНЕРАЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ В КУЛЬТУРЕ *in vitro*

© 2022 г. И. Н. Третьякова\*, @, М. Э. Пак\*, Н. В. Орешкова\*, \*\*, В. Е. Падутов\*\*\*

\*Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения РАН – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН,  
ул. Академгородок, 50/28, Красноярск, 660036 Россия\*\*Научно-образовательный центр геномных исследований Сибирского федерального университета,  
пр. Свободный, 79, Красноярск, 660041 Россия

\*\*\*Институт леса НАН Беларуси, ул. Пролетарская, 71, Гомель, 246050 Беларусь

@E-mail: cultureinvitro@mail.ru

Поступила в редакцию 13.05.2021 г.

После доработки 04.03.2022 г.

Принята к публикации 14.03.2022 г.

В статье изложены результаты исследования регенерационной способности одиннадцати клеточных линий (КЛ) лиственницы сибирской, культивируемых *in vitro* на питательной среде АИ в течение одного–десяти лет. КЛ отличались по продуктивности и плоидности эмбрионных культур, морфогенезу соматических зародышей, способности их созревать и прорасти. Высокая регенерационная способность была установлена у КЛ6. Эмбрионные культуры этой клеточной линии продуцировали крупные глобулярные зародыши, имели высокую продуктивность эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ) и стабильную плоидность. Генотипирование по девяти ядерным микросателлитным локусам клонированных деревьев лиственницы показало полную идентичность их КЛ6, из которой они были получены. В семилетнем возрасте у клонов деревьев появились генеративные органы. В последующий весенне-летний период завершился процесс микро- и макроспорогенеза, происходило опыление и развитие семян.

**Ключевые слова:** соматический эмбриогенез, регенерация, клоны, генотипирование, *Larix*

DOI: 10.31857/S1026347022050195

Виды *Larix* – одни из основных лесообразователей России, занимают обширный ареал (Дылис, 1947; Рожков и др., 1991; Ирошников, 2004). Однако виды *Larix* характеризуются неравномерностью урожаев в многолетнем цикле и низким качеством семян. Наиболее сильно этот феномен проявляется у лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.), у которой урожай семян значительно ниже по сравнению с другими видами рода *Larix* (Третьякова и др., 2006). Сильное негативное влияние на урожай лиственницы сибирской оказывает повреждение почек лиственничной почковой галлицей *Dasineura rozhkovi* (Mat. et Nik). Однако в популяциях лиственницы встречаются единичные деревья, устойчивые к этому вредителю (Баранчиков, Малютина, 1987; Baranchikov, 2006).

Для реализации программ лесоразведения и лесовосстановления лиственничных лесов наиболее перспективным направлением является клонирование высокопродуктивных, устойчивых к патогенам деревьев лиственницы с использованием современных биотехнологий микроклонального размножения. Одна из них – биотехнология

соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro*, реализована за рубежом в программе Мульти-сортового лесного хозяйства (Multi Variety Forest, MVF) (Park *et al.*, 2014). Применение данной технологии в сочетании с криоконсервацией создает основу для получения хозяйственно ценных генетически тестированных клонов и элитных генотипов, а также позволяет сохранить генетические ресурсы лиственницы на долгие годы (Lelu *et al.*, 1994; Klimaszewska, Cug, 2002; Lelu-Walter *et al.*, 2008; Klimaszewska *et al.*, 2016).

В настоящее время биотехнология соматического эмбриогенеза разработана для следующих видов и гибридов *Larix*: *L. decidua* (von Aderkas *et al.*, 1990), *L. kaempferi* (Lelu-Walter, Paques, 2009); *L. occidentalis* (Thompson, von Aderkas, 1992), *L. × eurolepis* (*L. decidua* × *L. kaempferi*) (Klimaszewska, 1989; von Aderkas *et al.*, 1990; Lelu *et al.*, 1994), *L. × marschlinsii* (*L. kaempferi* × *L. decidua*) (Lelu *et al.*, 1994; Lelu-Walter, Paques, 2009), *L. leptolepis* (Wang *et al.*, 2007), *L. sibirica*, *L. sukaczewii*, *L. gmelinii* (Третьякова, Барсукова, 2012; Третьякова, Пак, 2018).

Выявлено, что соматический эмбриогенез идет под строгим генетическим контролем. Только отдельные деревья-доноры способны формировать эмбриогенные культуры и соматические зародыши в культуре *in vitro* (MacKay *et al.*, 2001, 2006; Третьякова, Барсукова, 2012). На видах с контролируемым соматическим эмбриогенезом был показан уровень генетического разнообразия при использовании молекулярных маркеров (хлоропластных, ядерных микросателлитов) (Helmerson *et al.*, 2004; Lelu-Walter *et al.*, 2008). Эмбриогенные культуры лиственницы могут характеризоваться генетической нестабильностью, также как и другие древесные растения (von Aderkas, Anderson, 1993; Burg *et al.*, 2007). В эмбриогенных культурах *L. marschlinii* (Fourre *et al.*, 1997), *L. decidua* (von Aderkas, Bonga, 1993; von Aderkas, Anderson, 1993; von Aderkas *et al.*, 2003), *L. leptolepis* (von Aderkas *et al.*, 1990), а также *Picea abies* (Lelu, 1987), *Pinus nigra* (Salajova, Salaj, 1992), *Pinus radiata* (O'Brien *et al.*, 1996) была обнаружена полиплоидия. Изучение локусов ядерных микросателлитов в клеточных линиях *Pinus pinaster* (Marum *et al.*, 2009), *Pinus sylvestris* (Burg *et al.*, 2007), *Abies cephalonica* (Aronen *et al.*, 1999; Krajňáková *et al.*, 2011), *Quercus subres* и *Quercus robus* (Endemann *et al.*, 2001; Lopes *et al.*, 2006; Wilhelm *et al.*, 2005), *Populus tremuloides* (Rahman, Rajora, 2001) показало повышенную частоту мутаций и генетическую нестабильность, что, вероятно, было стимулировано длительным культивированием эмбриогенных культур (ЭК). Гетерогенные клетки с генотипами, отличными от родительского дерева, также обнаружены в наших исследованиях 2–5-месячных клеточных линий, полученных из мегагаметофитов *L. sibirica* (Krutovsky *et al.*, 2014). Вместе с тем, в эмбриогенных культурах *P. abies*, *Picea glauca*, *Picea mariana* × *P. glauca*, *P. pinaster*, *Picea orientalis* соматическая изменчивость не обнаружена (Mo *et al.*, 1989; Eastman *et al.*, 1991; Tremblay *et al.*, 1999; Harvengt *et al.*, 2001; Helmersson *et al.*, 2004; Arrillaga *et al.*, 2014; Cabezas *et al.*, 2016; Ahn, Choi, 2017). Проведенный нами микросателлитный анализ длительно пролиферирующих эмбриогенных культур *L. sibirica* показал слабую аллельную изменчивость клеточных линий (Третьякова и др., 2016).

Несмотря на активные исследования по соматическому эмбриогенезу и соматической изменчивости эмбриогенных культур *Larix* и других хвойных видов, регенерация растений через биотехнологию соматического эмбриогенеза все еще остается проблематичной. Критическим моментом являясь процессы гистодифференцировки и созревания соматических зародышей, регенерации и адаптации в условиях почвенного субстрата (Klimaszewska, Суг, 2002; Белоруссова, Третьякова, 2008; Третьякова, Ижболдина, 2008; Третьякова, Барсукова, 2010; Пак и др. 2016).

Коллекция пролиферирующих эмбриогенных культур лиственницы сибирской ежегодно пополняется нами, начиная с 2008 г. Коллекционные клеточные линии были получены от трех генотипов №№ А4, 10 и 1(35) в результате свободного и контролируемого опыления (Третьякова и др., 2015; Пак и др., 2016). Для успешной регенерации соматических зародышей и получения клонированных растений необходимо изучить процесс реализации морфофизиологических программ, генетическую стабильность полученных эмбриогенных культур и соответствие их родительскому генотипу. В настоящей работе был проведен анализ соматической изменчивости клеточных культур (морфогенез, плоидность, генотипирование) и показано ее влияние на регенерационную способность отдельных клеточных линий. Кроме того, дано описание особенности роста клонированных деревьев и проведено их генотипирование на соответствие родительскому генотипу.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на одиннадцати эмбриогенных клеточных линиях, полученных из незрелых зиготических зародышей материнского дерева № А4, не имеющего внешних признаков повреждения (галлов) лиственничной почковой галлицей. Это дерево произрастает в дендрарии Института леса (Красноярск, 55°59'09" N 92°45'53" E). Шишки от свободного и контролируемого опыления собирали в середине июля в 2008–2019 гг. Зародыши на предсемядольной стадии развития вводили в культуру *in vitro* на среду АИ (Третьякова, 2012). Исследовали следующие КЛ: КЛ4 (2009; свободное опыление), КЛ5 (2009; перекрестное опыление *L. sibirica* × *L. sukaczewii*), КЛ6 (2011; свободное опыление), КЛ10 (2012; свободное опыление), КЛ107 (2013; свободное опыление), КЛ12 (2015; свободное опыление), КЛ16.1 (2016; контролируемое самоопыление), КЛ16.28 (2016; свободное опыление), КЛ17.7 (2017; перекрестное опыление *L. sibirica* × *L. sibirica*; дерево №10), КЛ17.16 (2017; свободное опыление), КЛ18.3 (2018; свободное опыление).

Введение в культуру, индукция и пролиферация соматических зародышей были описаны нами ранее у лиственницы сибирской (Третьякова, 2012; Третьякова, Барсукова, 2012; Третьякова и др., 2015; Пак и др., 2016). Пролиферирующие эмбриогенные культуры субкультивировали на свежую питательную среду АИ через каждые две недели. Культуры инкубировали в темноте при температуре 24 ± 1°C.

**Созревание соматических зародышей.** Эксперименты по созреванию соматических зародышей лиственницы сибирской выполняли на базовой среде АИ, содержащей сахарозу (40 г л<sup>-1</sup>), абсцизовую кислоту (АБК, 121 мкМ), индолилмасля-

ную кислоту (ИМК, 1 мкМ) и полиэтиленгликоль (ПЭГ, М.в. 8000, 10%). В качестве желирующего агента использовали Gelrite (4 г л<sup>-1</sup>). Культивирование осуществляли в темноте при температуре 24 ± 1°С. Регуляторы роста (АБК и ИМК), а также L-глутамин и аскорбиновую кислоту добавляли в охлажденную питательную среду после автоклавирования методом холодной стерилизации с использованием бактериальных фильтров (TRP, Швейцария, размер пор 0.22 мкм).

**Проращение соматических зародышей.** Для проращивания соматических зародышей использовали базовую питательную среду 1/2АИ, в которой в 2 раза была снижена концентрация микро-, макроэлементов, железа и сахарозы, а также исключены регуляторы роста, источники органического азота и витаминов. Соматические зародыши считали проросшими при появлении корешка. Проростки (после 5–12-ти нед. периода проращивания) переносили в стеклянные сосуды, содержащие стерильный почвенный субстрат (песок : вермикулит : торф = 1 : 1 : 1), увлажненный 25%-ным раствором солей (среда АИ с 25%-м содержанием макро-, микросолей и железа). Культивирование осуществляли на свету при 24 ± 1°С в условиях климатикамеры.

**Гистологический анализ.** Для проведения гистологического анализа использовали временные препараты. Свежую эмбрионально-суспензорную массу (ЭСМ) помещали на предметное стекло и окрашивали 2%-ным водным раствором сафранина 2–3 мин. Для “двойного окрашивания” применяли 1%-ный раствор ацетокармина и 0.5%-ный раствор синего Эванса (Gupta, Durzan, 1987). Далее добавляли каплю глицерина и накрывали препарат покровным стеклом.

Продуктивность эмбриогенных клеточных линий оценивали, подсчитывая число соматических зародышей в 1 г пролиферирующей ЭСМ через неделю после пересадки. Индекс роста рассчитывали по формуле:

$I = (W_t - W_0)/W_0$ , где  $W_0$  – начальная масса каллуса, г;  $W_t$  – масса каллуса в конце цикла выращивания, г (Дитченко, 2007; Farshadfar, Amiri, 2016).

**Микросателлитный анализ.** Для генотипирования микросателлитных локусов, выделяли ДНК из хвои материнского дерева № А4, эмбрионально-суспензорной массы КЛ6 и из хвои деревьев, регенерированных из КЛ6. ДНК выделяли с помощью СТАВ-метода (Devey *et al.*, 1996). Качество и количество ДНК проверяли с помощью Флюорометра Qubit 2 (“Invitrogen”, США). Выделенную ДНК использовали для ПЦР-анализа с девятью парами олигонуклеотидов, разработанных ранее для микросателлитного генотипирования различных видов лиственницы (Krutovsky *et al.*, 2014). Микросателлитные локусы и условия ПЦР, которые использовались в данном исследовании,

приведены в табл. 1. Использовали наборы для ПЦР анализа GenePak® PCRCORE (ООО “Лаборатория Изоген”, Россия). ПЦР-амплификацию проводили на приборе ДНК-амплификатор T100 ThermalCycler (“Bio-Rad”, США). Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 6%-ном полиакриламидном геле в камерах для вертикального электрофореза с использованием Tris-EDTA-боратного электродного буфера. Гели окрашивали в растворе бромистого этидия и визуализировали с помощью системы гель документирования Gel Imager-2 (“Хеликон”, Россия). Молекулярную массу фрагментов определяли путем сравнения со стандартным маркером с помощью программного обеспечения PhotoCapt (“Vilber”). Плазмидную ДНК pBR322, расщепленную рестриктазой *HpaII*, использовали в качестве маркера.

**Цитогенетический анализ.** Цитогенетический анализ проводили по общепринятой для хвойных методике (Правдин и др., 1972, Пухальский и др., 2007) с собственными модификациями (Горякина и др., 2017). Окрашивали образцы 1%-ным ацетогематоксилином. Просмотр микроскопических образцов осуществляли с помощью микроскопа “МИКМЕД-6” (“ЛОМО”, Россия) и цифровой камеры МС-12 (“ЛОМО”, Россия). Число хромосом определяли не менее чем в 100 метафазных пластинках для каждой клеточной линии.

**Статистический анализ.** Статистический анализ проводили с использованием стандартных методик (Шмидт, 1984) с помощью Microsoft Excel (“Microsoft Corporation”, США) и Statistica 6.0 (“Tulsa Scientific”, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Анализ пролиферирующих клеточных линий.** Пролиферирующие ЭК разного возраста (от одного года до десяти лет) (табл. 2) внешне были представлены рыхлыми структурами белого или кремового цвета, которые активно пролиферировали (рис. 1, 2). Интенсивность роста ЭК значительно варьировала между различными клеточными линиями. Анализ роста ЭК в период между субкультивированиями показал, что КЛ4 растет быстрее, чем другие клеточные линии. Индекс роста данной КЛ составил 3.07 и был в 2–3 раза выше по сравнению с другими КЛ (рис. 3). Прирост КЛ4 за 14 суток, в среднем, составил 0.77 ± 0.03 г.

Проведенные нами ранее исследования показали, что ЭК лиственницы состояли из ЭСМ (Третьякова и др., 2016). Число глобулярных соматических зародышей у разных КЛ лиственницы колебалось от 2040 ± 189 (КЛ6) до 11103 ± 259 (КЛ10) на 1 г сырой ЭСМ (Третьякова и др., 2016). В ЭСМ были сформированы полиэмбриональные комплексы со множественными эмбрионами. Эти комплексы включали 2–8 или даже боль-

**Таблица 1.** Микросателлитные локусы, отобранные для генотипирования лиственницы сибирской (*Larix sibirica*)

| Локус                | Мотив  | Размер фрагмента | t°C<br>отжига        | Источник литературы        |
|----------------------|--|------------------|----------------------|----------------------------|
| <i>bcLK056</i>       | (AG) <sub>20</sub>                                       | 174–200          | Touchdown<br>63–53°C | Isoda, Watanabe, 2006      |
| <i>bcLK066</i>       | (TG) <sub>12</sub>                                       | 155–172          |                      |                            |
| <i>bcLK224</i>       | (AG) <sub>17</sub>                                       | 152–168          |                      |                            |
| <i>bcLK260</i>       | (TG) <sub>14</sub> (AG) <sub>9</sub>                     | 115–126          |                      |                            |
| <i>bcLK232</i>       | (AG) <sub>19</sub>                                       | 142–178          |                      |                            |
| <i>bcLK225</i>       | (GA) <sub>20</sub>                                       | 180–213          |                      |                            |
| <i>bcLK235</i>       | (TC) <sub>9</sub> (AC) <sub>2</sub> AG(AC) <sub>14</sub> | 177–220          |                      |                            |
| <i>UBCLXtet-1-22</i> | (TATC) <sub>9</sub> (TA) <sub>12</sub>                   | 175–250          | 58°C                 | Chen <i>et al.</i> , 2009  |
| <i>UAKLly6</i>       | (GT) <sub>17</sub>                                       | 214–264          |                      | Khasa <i>et al.</i> , 2006 |

**Таблица 2.** Продуктивность соматических эмбрионных клеточных линий *Larix sibirica*

| Клеточная линия | Дерево-донор              | Год получения | Число зрелых соматических зародышей на 1 г сырого веса ЭСМ, шт | Частота созревания зародышей, от числа глобулярных % |
|-----------------|---------------------------|---------------|--|--|
| 4*              | A4                        | 2009          | 1221 ± 138   | 33   |
| 5*              | A4 × <i>L. sukaczewii</i> | 2009          | Зародыши не созревают  | 0  |
| 6*              | A4                        | 2011          | 13 ± 3   | 0.6  |
| 10*             | A4                        | 2012          | 662 ± 73.5   | 0.6  |
| 107*            | A4                        | 2013          | 10 ± 2   | –  |
| 12              | A4                        | 2015          | 120 ± 12   | 6  |
| 16.1            | A4 × A4                   | 2016          | 51 ± 7   | 1.7  |
| 16.28           | A4                        | 2016          | Единичные зародыши   | –  |
| 17.7            | A4 × 10                   | 2017          | 110 ± 55   | 3.7  |
| 17.16           | A4                        | 2017          | 11 ± 5   | 0.4  |
| 18.3            | A4                        | 2018          | Единичные зародыши   | –  |

Примечание.\* Описание клеточных линий приведено в статье Третьяковой и др., 2016.

ше эмбрионов (Третьякова, Пак, 2018). Мультипликация соматических зародышей шла через кливаж и образование адвентивных почек на суспензоре. Кливаж происходил независимо от размера глобулы и активно шел как в мелких (до 90 мкм), так и в крупных (282 мкм) глобулах (Третьякова, Пак, 2018).

**Цитогенетическое исследование.** Клетки соматических зародышей однолетней КЛ17.7 и двухлетней КЛ16.28, имели стабильное число хромосом ( $2n = 24$ , характерное для *L. sibirica*). У трехлетней КЛ12 большинство клеток содержали 23 + 1 хромосому, длина которой была аномальной (делеция сегмента хромосомы). Аналогичная ситуация наблюдалась и в КЛ107: только 1% клеток содержали 24 хромосомы без аберраций. У возрастных КЛ4 и КЛ5 (возраст культур 10 лет) была обнаруже-

на цитогенетическая нестабильность, что проявлялось в значительной вариации числа хромосом в метафазных клетках. Заслуживает внимания КЛ6, которая в течение семи лет культивирования оставалась цитогенетически стабильной (рис. 4).

**Созревание соматических зародышей.** Для созревания соматических зародышей эмбрионные культуры переносили на среду АИ, дополненную АБК и ИМК. После одной–двух недель созревания соматические эмбрионы отделялись из полиэмбриональных комплексов. Гистодифференцировка зародыша была отчетливо видна уже через две–три недели культивирования на среде с АБК. На семядольной стадии развития зародыша происходила элиминация клеток суспензоров. Клеточные линии были ранжированы в соответствии с их способностью к созреванию. Мелкие соматиче-

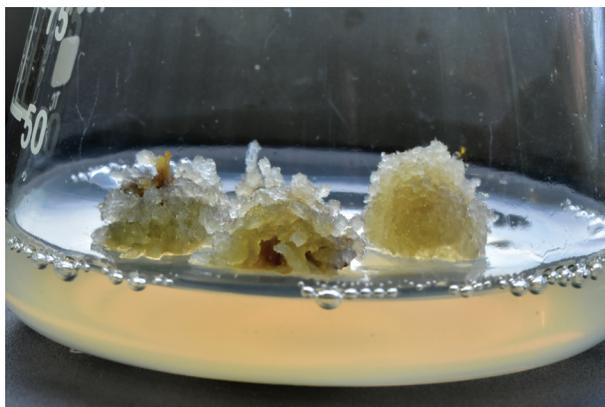


Рис. 1. Эмбрионально-супензорная масса лиственницы сибирской.

ские эмбрионы КЛ5 с коротким супензором оставались на глобулярной стадии развития и не созревали. Соматические зародыши КЛ4 созревали очень быстро за 20–45 сут. Среднее значение длины зрелых эмбрионов КЛ4 составляло 1.2 мм. Число зрелых соматических эмбрионов в КЛ4 составило  $1221 \pm 138$  на 1 г сырого веса ЭСМ (частота созревания – 33%, табл. 2). У остальных клеточных линий процесс созревания зародышей занимал до 60 сут.

В процессе созревания соматических зародышей лиственницы были отмечены многочисленные нарушения морфогенеза в различных областях эмбриона. Некоторые эмбрионы образовывали каллус в области центральных и базальных доменов, область семядольного кольца была аномально утолщена. Их размеры (средняя длина 2.9 мм; толщина 2 мм) превышали обычные размеры зрелых зиготиче-

ских эмбрионов (длина 2 мм; толщина 0.5 мм). У КЛ6 морфогенез зародышей шел без отклонений, однако частота их созревания была низкой (0.6%) (табл. 2).

**Прорастание соматических зародышей.** Все эмбрионы, полученные в результате экспериментов по созреванию, были использованы для испытаний на прорастание. Появление корешка у соматических эмбрионов происходило в течение 7–10 дней на среде АИ с пониженным в 2 раза содержанием сахарозы ( $10 \text{ г л}^{-1}$ ), микро-, макроэлементов, железа, без добавления гормонов, витаминов и источников органического азота. В период прорастания у соматических зародышей наблюдался ряд отклонений в развитии: уменьшение числа семядолей, утолщение (появление каллуса) в области корня. У КЛ4 при активном прорастании зародышей (83.3%) происходило образование каллуса в области корешка у большинства из них, что препятствовало дальнейшему прорастанию. Регенеранты без отклонений в развитии составили от 5 до 15%. Стабильное прорастание эмбрионов было обнаружено у КЛ6. Прорастающие зародыши переносили в почвенный субстрат и выращивали в условиях климатикамеры. В 2012 г. сеянцы, полученные от КЛ6 были высажены в теплицу.

**Генотипирование по микросателлитным локусам.** Трехлетние клонированные саженцы были высажены в почву лесопитомника опытной станции “Погорельский Бор” ИЛ СО РАН, в 38 км от Красноярска. Генотипирование по девяти микросателлитным локусам дерева-донора, КЛ6 и пятнадцати клонированных деревьев показало, что только два локуса bcLK235 и UAKLly6 были гетерозиготными у материнского дерева № А4, в

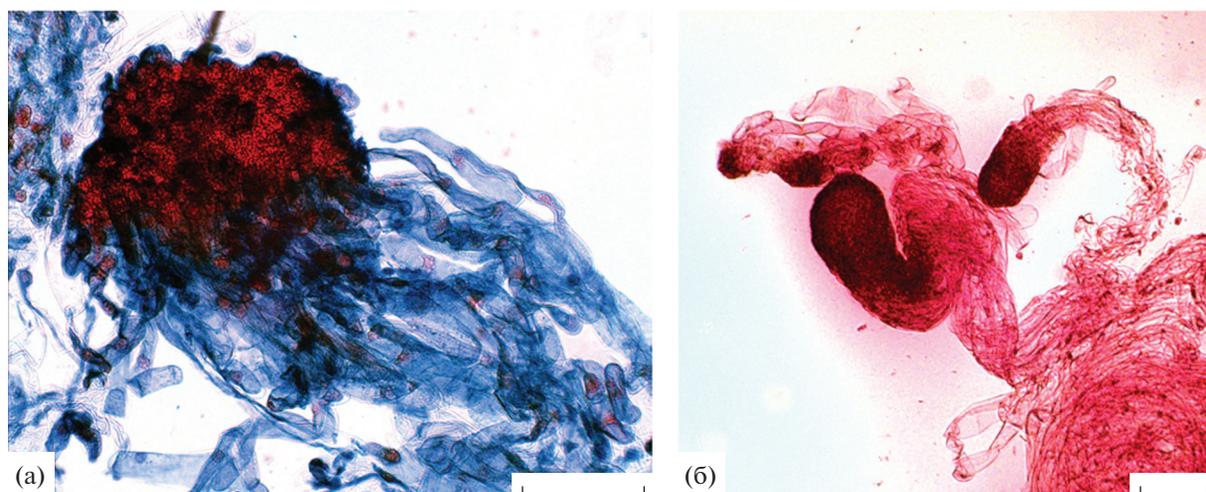


Рис. 2. Гистология эмбрионально-супензорной массы лиственницы сибирской. (а) – “двойное окрашивание” эмбрионального комплекса (клетки глобулы, т.е. собственно зародыша – красные, клетки супензора – синие); (б) – глобулярные соматические зародыши. Масштаб 200 мкм.

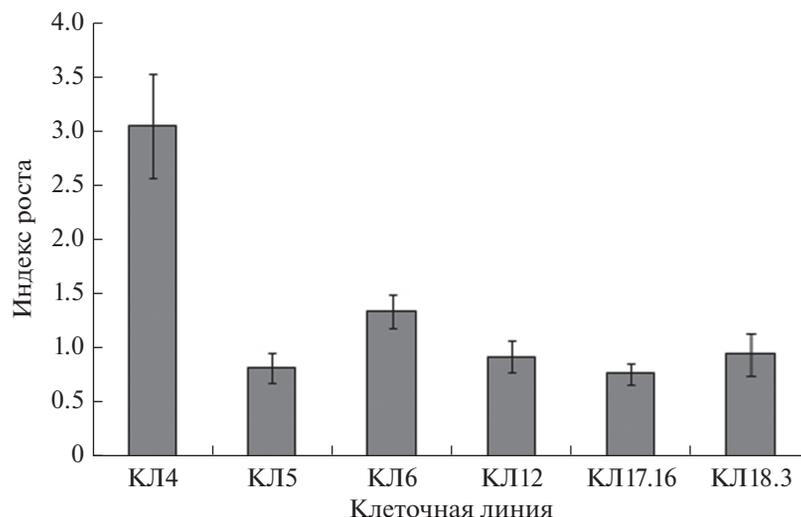


Рис. 3. Индекс роста эмбрионных клеточных линий лиственницы сибирской.

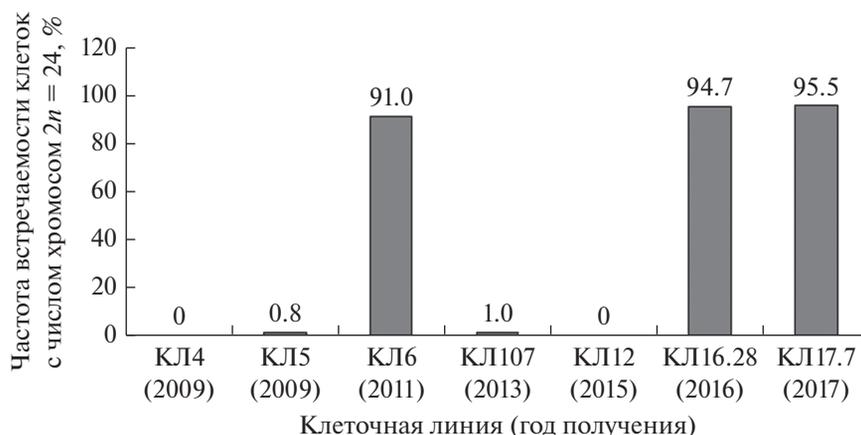


Рис. 4. Частота встречаемости диплоидного числа хромосом ( $2n = 24$ ) у клеточных линий лиственницы сибирской разного возраста.

то время как КЛ6 и клоны, полученные от этой клеточной линии, оказались гомозиготами с одним аллелем, идентичным материнскому генотипу. По локусам bcLK056, bcLK066, bcLK224, bcLK232, bcLK260, UBCLXtet\_1-22 у клонов и КЛ6 наблюдалась полная идентичность генотипу дерева-донора №А4. По локусу bcLK225 в данной клеточной линии был выявлен генотип отличный от родительского (табл. 3). При этом клоны полностью идентичны КЛ6, из которой они были получены.

Клонированные деревья из КЛ6 успешно растут в течение восьми лет в почве лесопитомника. Деревья не имеют никаких признаков повреждения лиственничной почковой галлицей. В семилетнем возрасте у клонированных деревьев появились генеративные органы, которые развились в последующий весенне-летний период в микро- и мегастро-

билах. В восьмилетнем возрасте клоны сформировали семена (рис. 5).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Основным преимуществом соматического эмбриогенеза, как стратегии вегетативного размножения хвойных видов (по сравнению с половым размножением), является высокая пролиферативная активность эмбрионной культуры, которую возможно поддерживать в течение длительного периода времени при условии регулярного субкультивирования или путем криоконсервации (Klimaszewska *et al.*, 2009; Lelu-Walter, Pâques, 2009). Образование соматических зародышей в длительно пролиферирующей эмбрионной культуре гибридных лиственниц (*L. × eurolepis* и *L. × marschlinii*) может поддерживаться в течение десяти

**Таблица 3.** Микросателлитные аллели генотипа дерева-донора А4, полученной от него клеточной линии КЛ6 и клонированных деревьев лиственницы сибирской

| Локус         | А4                         | КЛ6         | 1           | 3           | 4           | 5           | 6           | 7           | 8           | 9           | 10          | 11          | 12          | 13          | 14          | 15          | 16          |
|---------------|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| bcLK056       | 145/<br>145                | 145/<br>145 | 145/<br>145 | 145/<br>145 | 145/<br>145 | 145/<br>145 | 145/<br>145 | 145/<br>145 | 145/<br>145 | 145/<br>145 | 145/<br>145 | 145/<br>145 | 145/<br>145 | 145/<br>145 | 145/<br>145 | 145/<br>145 | 145/<br>145 |
| bcLK066       | 151/<br>151                | 151/<br>151 | 151/<br>151 | 151/<br>151 | 151/<br>151 | 151/<br>151 | 151/<br>151 | 151/<br>151 | 151/<br>151 | 151/<br>151 | 151/<br>151 | 151/<br>151 | 151/<br>151 | 151/<br>151 | 151/<br>151 | 151/<br>151 | 151/<br>151 |
| bcLK224       | 130/<br>130                | 130/<br>130 | 130/<br>130 | 130/<br>130 | 130/<br>130 | 130/<br>130 | 130/<br>130 | 130/<br>130 | 130/<br>130 | 130/<br>130 | 130/<br>130 | 130/<br>130 | 130/<br>130 | 130/<br>130 | 130/<br>130 | 130/<br>130 | 130/<br>130 |
| bcLK225 *     | <b>205</b> /<br><b>205</b> | 183/<br>183 |
| bcLK232       | 134/<br>134                | 134/<br>134 | 134/<br>134 | 134/<br>134 | 134/<br>134 | 134/<br>134 | 134/<br>134 | 134/<br>134 | 134/<br>134 | 134/<br>134 | 134/<br>134 | 134/<br>134 | 134/<br>134 | 134/<br>134 | 134/<br>134 | 134/<br>134 | 134/<br>134 |
| bcLK235 *     | <b>216</b> /<br>208        | 208/<br>208 |
| bcLK260       | 102/<br>102                | 102/<br>102 | 102/<br>102 | 102/<br>102 | 102/<br>102 | 102/<br>102 | 102/<br>102 | 102/<br>102 | 102/<br>102 | 102/<br>102 | 102/<br>102 | 102/<br>102 | 102/<br>102 | 102/<br>102 | 102/<br>102 | 102/<br>102 | 102/<br>102 |
| UBCLXtet_1-22 | 180/<br>180                | 180/<br>180 | 180/<br>180 | 180/<br>180 | 180/<br>180 | 180/<br>180 | 180/<br>180 | 180/<br>180 | 180/<br>180 | 180/<br>180 | 180/<br>180 | 180/<br>180 | 180/<br>180 | 180/<br>180 | 180/<br>180 | 180/<br>180 | 180/<br>180 |
| UAKLly6 *     | 240/<br><b>234</b>         | 240/<br>240 |

Примечание. \* Полуэпигенным выделены аллели, обнаруженные только у материнского дерева.

лет. При этом, по эмбриогенной активности возрастные культуры не отличались от молодых пролиферирующих КЛ (Lelu-Walter, Pâques, 2009). Культуры, полученные из мегagamетофитов *L. decidua*, демонстрировали эмбриогенную способность в течение 17 лет. Однако плоидность и содержание ДНК в этих культурах увеличивались (von Aderkas *et al.*, 2003). У других хвойных видов, таких как *P. pinaster*, способность самоподдержания эмбриогенной культуры была короче (Klimaszewska *et al.*, 2009).

В настоящем исследовании эмбриогенный потенциал длительно пролиферирующих эмбриогенных культур лиственницы сибирской оставался неизменным до десяти лет. В высокопродуктивной эмбриогенной линии КЛ4 большинство соматических зародышей созревали и прорастали (табл. 2). Однако во время прорастания в области корешка образовывался каллус. У КЛ5 (*L. sibirica* × *L. sukaczewii*) мелкие многочисленные зародыши активно размножались через кливаж в течение десяти лет, но созревание таких зародышей не происходило. Другое можно сказать о КЛ6, у которой формировались крупные соматические зародыши. Зародыши данной КЛ созревали и прорастали, затем успешно росли в почвенном субстрате. Клонированные деревья КЛ6 восемь лет растут в почве лесопитомника. Они отличаются интенсивным ростом и сверххранением появлением генеративных органов.

Известно, что эмбриогенные культуры могут характеризоваться генетической нестабильностью. Полиплоидия была описана в ЭСМ у *P. s nigra* (Salajova, Salaj, 1992), *L. decidua*, *L. leptolepis*, *L. marschinsii* (Nkongolo, Klimaszewska, 1995) и *P. radiata* (O'Brien *et al.*, 1996). У семилетних эмбриогенных КЛ *Quercus robur* частота полиплоидии (тетраплоидии), достигала 8%, а частота мутаций в течение соматического эмбриогенеза в зависимости от генотипа донорского дерева составляла 29.2–62.5% (Wilhelm *et al.*, 2005). Мутации по четырем микросателлитным локусам были обнаружены в эмбриогенных КЛ *Pinus sylvestris*. Эти мутации произошли во время пролиферации клеток. Мутировавшие КЛ теряли способность к дифференцировке при созревании семядольных соматических зародышей (Fourge *et al.*, 1997; De Verno, 1999). Генетические вариации по семи микросателлитным локусам были обнаружены в эмбриогенных клеточных линиях *P. pinaster* после 6–22-месячной пролиферации *in vitro*, а также у 9.6% проростков данного вида (Marum *et al.*, 2009). Однако корреляция между наличием мутаций в клетках эмбриогенного каллуса и аномальными фенотипами проростков *P. pinaster* не была выявлена (Miguel, Marum, 2011). Наличие изменений было отмечено в геноме эмбриогенной культуры *P. abies* и *Picea omorica*, культивируемых в течение 42–44 месяцев (Hazubska-Przybył, Der-ing, 2017).



**Рис. 5.** Клоны лиственницы сибирской на стационаре “Погорельский бор” ИЛ СО РАН. (а) – начало вегетации (весна); (б) – вегетация клонов (лето); (в) – верхушечный побег с генеративными органами; (г) – женская шишка до опыления; (д) – микростробил.

Генетическая изменчивость, определяемая при помощи микросателлитных маркеров, была показана в культуре мегagamетофитов *P. pinaster*. Однако из 23 КЛ *P. pinaster* лишь одна КЛ оказалась генетически стабильной (Arrillaga *et al.*, 2014). Анализ каллусных линий *P. abies* также показал генетическую стабильность только у одной клеточной линии (Nazubska-Przybył *et al.*, 2013). В наших экспериментах из одиннадцати КЛ (пять из которых были длительно пролиферирующими), только одна длительно культивируемая линия (КЛ6) продемонстрировала генетическую стабильность как по числу хромосом, так и по микросателлитным локусам.

Ряд авторов (Mo *et al.*, 1989; Isabel *et al.*, 1993; Fourre *et al.*, 1997; Harvengt *et al.*, 2001; Helmersson *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2018) сообщали об отсутствии соматических вариаций в процессе соматического эмбриогенеза у голосеменных растений (*P. abies*, *Picea glauca*, *Picea mariana*, *P. mariana* ×

*P. glauca*, *P. pinaster*, *Pinus etliottii* × *Pinus caribaea*) и других видов (Rahman and Rajoga, 2001). Высокая стабильность трех ядерных микросателлитных локусов была обнаружена у *P. glauca* во время соматического эмбриогенеза и в регенерантах (Helmersson *et al.*, 2004). Исследования методом проточной цитометрии плоидности гибридных видов *P. ellioi* var. *elliottii* × *P. caribaea* var. *hondurensis* показали, что эмбриогенные культуры имели уровень плоидности, аналогичный их материнским растениям (Nunes *et al.*, 2018).

Микросателлитный анализ, проведенный нами ранее на ЭСМ эмбриогенных культур *L. sibirica*, показал слабую аллельную вариабельность между КЛ и деревом-донором (Третьякова и др., 2016). Эти данные соответствовали литературным источникам, в которых указывалось на генетическую стабильность эмбриогенных культур некоторых видов *Picea* и *Pinus* (Mo *et al.*, 1989; Isabel *et al.*, 1993; Fourre *et al.*, 1997; Harvengt *et al.*, 2001; Helmersson

*et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2018). Вероятно, в значительном большинстве случаев генетическая стабильность эмбрионных культур сохраняется у молодых клеточных линий, а с возрастом культуры теряют генетическую стабильность. Это было показано в наших экспериментах с листовенницей сибирской. Плоидность эмбрионных КЛ начинает изменяться с трехлетнего возраста и только семилетние культуры КЛ6 остаются генетически стабильными. Хелмерсон с соавторами (Helmerson *et al.*, 2004) предположили, что изменения числа хромосом и повреждения ДНК в клетках эмбрионной культуры хвойных может привести к элиминации мутирующих зародышей и выживанию тех из них, которые оставались генетически стабильными. Это предположение может объяснить появление нормальных соматических эмбрионов, генетически идентичных исходным эксплантам (Helmerson *et al.*, 2004). Была высказана гипотеза (Vendrame *et al.*, 1999), что генетическая изменчивость культуры *Carya illinoensis* контролируется генотипом (а не возрастом культуры). Таким образом, можно предположить, что мутировавшие клетки, обнаруженные в соматических зародышах *L. sibirica*, также как и *P. abies*, *P. glauca* и *P. mariana* × *P. glauca* (Helmerson *et al.*, 2004) в процессе созревания и прорастания соматических зародышей элиминируются. Следовательно, можно объяснить, почему возрастные КЛ, такие как генетически стабильная КЛ6 у листовенницы сибирской, могут продуцировать жизнеспособные соматические зародыши, которые успешно созревают и способны развиваться в быстро растущие растения. Эти восьмилетние деревья *L. sibirica* успешно растут в почве питомника. Клоны листовенницы сибирской, полученные из КЛ6, не имеют морфологических отклонений, внешних признаков повреждения листовенничной почковой галлицей и генетически стабильны (табл. 3). Совершенствование протоколов получения соматических зародышей и отбор генетически стабильных клеточных линий листовенницы являются перспективными направлениями для создания высокопродуктивных, устойчивым к энтомовам вредителям листовенничных насаждений в России и республике Беларусь.

\* \* \*

Из одиннадцати проанализированных нами клеточных линий листовенницы сибирской только одна КЛ6 имела высокую регенерационную способность. Эмбрионные культуры этой линии продуцировали крупные глобулярные зародыши, были стабильными по продуктивности ЭСМ, плоидности и имели слабую изменчивость по микросателлитным локусам. На стадии созревания соматические зародыши данной линии завершали эмбриогенез. Однако все они проросли и сеянцы

успешно росли в теплице и далее в почве лесопитомника. Клонированные деревья были генетически стабильными и полностью соответствовали КЛ6, из которой они были получены. В семилетнем возрасте у деревьев, полученных из эмбрионных культур, произошла закладка генеративных органов, которые развились в последующий весенне-летний период в возрасте восьми лет. Таким образом, создание высокопродуктивных, устойчивых к патогенам клоновых плантаций листовенницы в Сибири из эмбрионных клеточных культур очень перспективно.

**Финансирование.** Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности в рамках научных проектов № 19-44-240009 и РФФИ-Бел\_а № 18-54-00010.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баранчиков Ю.Н., Малютин В.С. Рост почек и устойчивость листовенниц к поражению почковой галлицей // Лесоведение. 1987. № 3. С. 39–45.
- Белорусова А.С., Третьякова И.Н. Особенности формирования соматических зародышей у листовенницы сибирской: эмбриологические аспекты // Онтогенез. 2008. Т. 39. № 2. С. 106–115.
- Горячкина О.В., Пак М.Э., Третьякова И.Н. Цитогенетические особенности эмбрионных клеточных линий *Larix sibirica* (Ledeb.) в культуре *in vitro* // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2017. № 39. С. 140–153.
- Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений: Метод. рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов // Минск: БГУ, 2007. 25 с.
- Дылис Н.В. Сибирская листовенница // М.: Изд. МОИП, 1947.
- Ирошников А.И. Лиственницы России. Биоразнообразие и селекция // М.: ВНИИЛМ. 2004. 182 с.
- Пак М.Э., Иваницкая А.С., Двойнина Л.М., Третьякова И.Н. Эмбрионный потенциал длительно пролиферирующих клеточных линий *Larix sibirica in vitro* // Сибирский лесной журн. 2016. № 1. С. 27–38.
- Правдин Л.Ф., Бударгин В.А., Кружлик М.В., Шершукова О.П. Методика хромосомного изучения хвойных пород I Лесоведение. 1972. № 2. С. 67–75.
- Пухальский В.А., Соловьёв А.А., Бадаева Е.Д., Юрцев В.Н. Практикум по цитологии и цитогенетике растений // М.: Изд. КолосС, 2007.
- Рожков А.С., Хлиманкова Е.С., Степанчук Е.С. Восстановительные процессы у хвойных при дефолиации. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. 88 с.
- Третьякова И.Н. Способ микрклонального размножения листовенницы сибирской в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез на среде АИ для

- плантационного лесовыращивания. Патент РФ RU 2456344 С2. М.: Федеральная служба по интеллектуальной собственности, 2012.  
<http://www.freepatent.ru/images/patents/5/2456344/patent-2456344.pdf>
- Третьякова И.Н., Баранчиков Ю.Н., Буглова Л.В., Белоруссова А.С., Романова Л.И. Особенности формирования генеративных органов лиственницы сибирской и их морфогенетический потенциал // Успехи современной биологии. 2006. Т. 126. № 5. С. 472–481.
- Третьякова И.Н., Барсукова А.В. Сохранение генофонда хвойных видов Сибири при помощи соматического эмбриогенеза *in vitro* – современного метода биотехнологии // Хвойные boreальной зоны. 2010. Т. 27. № 1–2. С. 203–206.
- Третьякова И.Н., Барсукова А.С. Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* трех видов лиственницы // Онтогенез. 2012. Т. 43. № 6. С. 425–435.
- Третьякова И.Н., Иваницкая А.С., Пак М.Э. Продуктивность эмбрионных клеточных линий и их соматическая изменчивость у лиственницы сибирской *in vitro* // Лесоведение. 2015. № 1. С. 27–35.
- Третьякова И.Н., Изжболдина М.В. Особенности роста эмбрионного каллуса и получение соматических зародышей у кедра сибирского // Хвойные boreальной зоны. 2008. Т. 25. № 1–2.
- Третьякова И.Н., Пак М.Э., Иваницкая А.С., Орешкова Н.В. Особенности соматического эмбриогенеза длительно пролиферирующих клеточных линий *Larix sibirica in vitro* // Физиол. Раст. 2016. Т. 63. № 6. С. 912–822.
- Третьякова И.Н., Пак М.Э. Соматический полиэмбриогенез *Larix sibirica* в эмбрионной культуре *in vitro* // Онтогенез. 2018. Т. 49. № 4. С. 1–13.
- Шмидт В.М. Математические методы в ботанике. Учеб. пособие. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1984. 288 с.
- Ahn C.H., Choi Y.E. *In vitro* clonal propagation and stable cryopreservation system for *Platyclus orientalis* via somatic embryogenesis // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2017. V. 131. № 3. P. 513–523.
- Aronen T.S., Krajnakova J., Häggman H., Ryyänen L.A. Genetic fidelity of cryopreserved embryonic cultures of open-pollinated *Abies cephalonica* // Plant Sci. 1999. V. 142. P. 163–172.
- Arrillaga I., Guevara M.A., Muñoz-Bertomeu J., Lázaro-Gimeno D., Sáez-Laguna E., Díaz L.M., Torralba L., Mendoza-Ponderous I., Segura I., Cervera M.T. Selection of haploid cell lines from megagametophyte cultures of maritime pine as a DNA source for massive sequencing of the species // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2014. V. 118. P. 147–155.
- Baranchikov Yu.N. Factors of resistance to the larvae of gall midge *Dasineura rozhkovi* Mam. et Nik. (Diptera, Cecidomyiidae) in larch // Russian J. Ecology. 2006. V. 37.4. P. 288–290.
- Burg K., Helmersson A., Bozhkov P., von Arnold S. Developmental and genetic variation in nuclear microsatellite stability during somatic embryogenesis in pine // J. Exp. Bot. 2007. V. 58. P. 687–698.
- Cabezas J.A., Morcillo M., Vélez M.D., Díaz L., Segura J., Cervera M.T., Arrillaga I. Haploids in conifer species: characterization and chromosomal integrity of a maritime pine cell line // Forest. 2016. V. 7. P. 274.
- Chen C., Liewlaksaneeyanawin C., Funda T., Kenawy A., Newton C.H., El-Kassaby Y.A. Development and characterization of microsatellite loci in western larch (*Larix occidentalis* Nutt) // Mol Ecol Resour. 2009. V. 9. P. 843–845.
- De Verno L.L., Park Y.S., Bonga J.M., Barrett J.D. Somaclonal variation in cryopreserved embryonic clones of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss.] // Plant Cell Rep. 1999. V. 18. P. 948–953.
- Devey M.E., Bell J.C., Smith D.N., Neale D.B., Moran G.F. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and microsatellite markers // Theor Appl Genet. 1996. V. 92. P. 673–679.
- Eastman P., Webster F.B., Pitel J.A., Roberts D.R. Evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) using culture morphology and isozyme analysis // Plant Cell Rep. 1991. V. 10. P. 425–430.
- Endemann M., Hristoforoglu K., Stauber T., Wilhelm E. Assessment of age-related polyploidy in *Quercus robur* L. somatic embryos and regenerated plants using DNA flow cytometry // Biol Plant. 2001. V. 44. P. 339–345.
- Farshadfar E., Amiri R. *In vitro* application of integrated selection index for screening drought tolerant genotypes in common wheat // Acta agriculturae Slovenica. 2016. V. 107. № 2. P. 335–344.
- Fourre J.L., Berger P., Niquet L., André P. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches // Theor Appl Genet. 1997. V. 94. P. 159–169.
- Gupta P.K., Durzan D.J. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine // Bio/technology. 1987. V. 5. № 2. P. 147–151.
- Harvengt L., Trontin J.F., Reymond I., Canlet F., Pâques M. Molecular evidence of true-to-type propagation of a 3-year-old Norway spruce through somatic embryogenesis // Planta 2001. V. 213. P. 828–832.
- Hazubska-Przybył T., Chmielarz P., Michalak M., Dering M., Bojarczuk K. Survival and genetic stability of *Picea abies* embryonic cultures after cryopreservation using a pregrowth-dehydration method // Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2013. V. 113. № 2. P. 303–313.
- Hazubska-Przybył T., Dering M. Somaclonal variation during *Picea abies* and *P. omorika* somatic embryogenesis and cryopreservation // Acta Biologica Cracoviensia s. Botanica. 2017. V. 59. № 1. P. 93–103.
- Helmersson A., von Arnold S., Burg K., Bozhkov P.V. High stability of nuclear microsatellite loci during the early stages of somatic embryogenesis in Norway spruce // Tree Physiol. 2004. V. 24. P. 1181–1186.
- Isabel I.N., Tremblay L., Michaud M., Krusberg L., Hammerschlag E. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill) B.S.P. // Theor Appl Genet. 1993. V. 86. P. 81–87.
- Isoda K., Watanabe A. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Larix kaempferi*. Mol Ecol. 2006. V. 6. P. 664–666.
- Khasa D.P., Jaramillo-Correa J.P., Jaquish B., Bousquet J. Contrasting microsatellite variation between subalpine and western larch, two closely related species with different distribution patterns // Mol Ecol. 2006. V. 15. P. 3907–3918.
- Klimaszewska K., Noceda C., Pelletier G., Label P., Rodriguez R., Lelu-Walter M.A. Biological characterization

- of young and aged embryogenic cultures of *Pinus pinaster* (Ait) // In Vitro Cell Dev Biol Plant. 2009. V. 45. P. 20–33.
- Klimaszewska K., Cyr D.R. Conifer somatic embryogenesis: I. Development. // Dendrobiology. 2002. V. 48. P. 31–39.
- Klimaszewska K., Hargreaves C., Lelu-Walter M.A., Trontin J.F. Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000 // In vitro embryogenesis in higher plants. Humana Press, New York, NY. 2016. P. 131–166.
- Klimaszewska K. Recovery of somatic embryos and plantlets from protoplast cultures of *Larix × eurolepis* // Plant cell rep. 1989. V. 8. № 8. P. 440–444.
- Krajňáková J., Sutela S., Aronen T., Gömöry D., Vianello A., Häggman H. Long-term cryopreservation of Greek fir embryogenic cell lines: recovery, maturation and genetic fidelity // Cryobiology. 2011. V. 63. P. 17–25.
- Krutovsky K.V., Tretyakova I.N., Oreshkova N.V., Pak M.E., Kvitko O.V., Vaganov E.A. Somaclonal variation of haploid in vitro tissue culture obtained from Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) megagametophytes for whole genome de novo sequencing // In Vitro Cell Dev Biol – Plant. 2014. V. 50. P. 655–664.
- Lelu M.A., Bastien C., Klimaszewska K., Ward C., Charest P.J. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix × leptoeuropaea*): Part 1. Somatic embryo maturation // Plant Cell Tissue Organ Cult. 1994. V. 36. № 1. P. 107–115.
- Lelu M.A. Variations morphologiques et génétiques chez *Picea abies* obtenues après embryogénèse somatique. In: Annales de recherches sylvicoles de l'AFOCEL de l'année 1987. P. 35–47.
- Lelu-Walter M.-A., Pâques L.E. Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix × eurolepis* and *Larix × marschlinii*). Perspectives for breeding // Ann For Sci. 2009. V. 66. P. 104–104.
- Lelu-Walter M.A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K. Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2008. V. 92. № 1. P. 31–45.
- Lopes T., Pinto G., Loureiro J., Costa A., Santos C. Determination of genetic stability in long-term somatic embryogenic cultures and derived plantlets of cork oak using microsatellite markers // Tree Physiol. 2006. V. 26. P. 1145–1152.
- MacKay J., Becwar M., Park Y., Perfetti C., Cordero J., Pullman G., Lockhart L. Genetics of somatic embryogenesis in loblolly pine. In: Dean JF (ed) Proceedings (publ no 48) 26th southern forest tree improvement Conference, University of Georgia, Athens. 2001. P. 40–47.
- MacKay J.J., Becwar M.R., Park Y.-S., Cordero J.P., Pullman G.S. Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implications for breeding // Tree Genet Genomes. 2006. V. 2. P. 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11295-005-0020-2>
- Marum L., Rocheta M., Maroco J., Oliveira M., Miguel C. Analysis of genetic stability at SSR loci during somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*) // Plant Cell Rep. 2009. V. 28. P. 673–682.
- Miguel C., Marum L. An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond // J Exp Bot. 2011. V. 62. P. 3713–3725.
- Mo L.M., von Arnold S., Lagererantz U. Morphogenic and genetic stability in long term embryogenic cultures and somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) // Plant Cell Rep. 1989. V. 8. P. 375–378.
- Nkongolo K.K., Klimaszewska K. Cytological and molecular relationships between *Larix decidua*, *L. leptolepis* and *Larix × eurolepis*: identification of species specific chromosomes and synchronization of mitotic cell. Theor Appl Genet. 1995. V. 90. P. 827–834.
- Nunes S., Marum L., Farinha N., Pereira V.T., Almeida T., Sousa D., Mano N., Figueiredo J., Dias M.C., Santos C. Somatic embryogenesis of hybrid *Pinus eliottii* var. *eliottii* × *P. caribaea* var. *hondurensis* and ploidy assessment of somatic plants // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2018. V. 132. № 1. P. 71–84.
- O'Brien E.W., Smith D.R., Gardner R.C., Murray B.G. Flow cytometric determination of genome size in *Pinus* // Plant Sci. 1996. V. 115. P. 91–99.
- Park Y.-S. Conifer somatic embryogenesis and multi-varietal forestry. In: Fenning T (ed) Challenges and Opportunities for the World's Forests in the 21st Century. Forestry Sciences, Springer, Dordrecht. 2014. V. 81. P. 425–439.
- Rahman M., Rajora O. Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*) // Plant Cell Rep. 2001. V. 20. P. 531–536.
- Salajova T., Salaj J. Somatic embryogenesis in European black pine (*Pinus nigra* Arn.) // Biol Plant. 1992. V. 34. P. 213–218.
- Thompson R.G., von Aderkas P. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of western larch // Plant cell reports. 1992. V. 11. № 8. P. 379–385.
- Tremblay L., Levasseur C., Tremblay F.M. Frequency of somaclonal variation in plants of Black spruce (*Picea mariana*, Pinaceae) and White spruce (*P. glauca*, Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability // Am J Bot. 1999. V. 86. P. 1373–1381.
- Vendrame W.A., Kochert G., Wetzstein H.Y. AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos // Plant Cell Report. 1999. V. 18. P. 853–857.
- Von Aderkas P., Pattanavibool R., Hristoforoglu K., Ma Y. Embryogenesis and genetic stability in long term megagametophyte-derived cultures of larch // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2003. V. 74. P. 27–34.
- Von Aderkas P., Klimaszewska K., Bonga J.M. Haploid and diploid embryogenesis in *Larix leptolepis*, *L. decidua* and their reciprocal hybrids // Can. J. For. Res. 1990. V. 20. P. 9–14.
- Von Aderkas P., Anderson P. Aneuploidy and polyploidization in haploid tissue cultures of *Larix deciduas* // Physiol Plant. 1993. V. 88. P. 73–77.
- Von Aderkas P., Bonga J.M. Plants from haploid tissue culture of *Larix deciduas* // Theoretical and Applied Genetics. 1993. V. 87. № 1–2. P. 225–228.
- Wang X.X., Lu L.D., Hao H.Q., Teng N.J., Chen T., Guo Y.M., Yang Y.G., Guo Z.C., Lin J.X. High-efficiency somatic embryogenesis and morphohistology and histochemistry of somatic embryo development in *Larix leptolepis* Gordon // Forestry Studies in China. 2007. V. 9. № 3. P. 182–188.
- Wilhelm E., Hristoforoglu K., Fluch S., Burg K. Detection of microsatellite instability during somatic embryogenesis of oak // Plant Cell Rep. 2005. V. 23. P. 790–795.

## The Regenerative Capacity of Siberian Larch Cell Lines *in vitro*

I. N. Tretyakova<sup>1, #</sup>, M. E. Park<sup>1</sup>, N. V. Oreshkova<sup>1, 2</sup>, and V. E. Padutov<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Forest, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS", Akademgorodok, 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russia

<sup>2</sup> Genome Research and Education Center, Siberian Federal University, Svobodny pr., 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia

<sup>3</sup> Forest Research Institute of NASB, Proletarskaya st., 71, Gomel, 246050 the Republic of Belarus

<sup>#</sup>e-mail: cultureinvitro@mail.ru

The regenerative capacity of eleven cell lines (CLs) of Siberian larch cultivated *in vitro* on the AI nutrient medium for one to ten years was studied. CLs differed in the productivity and ploidy of embryogenic cultures, the morphogenesis of somatic embryos, and their ability to mature and germinate. A high regenerative capacity was found in CL6. Embryogenic cultures of the CL6 produced large globular embryos, had a high productivity of the embryonal-suspensor mass (ESM) and stable ploidy. According to microsatellite analysis (nine loci), cloned larch trees are complete identical to the CL6, from which they were obtained. Seven-year-old tree clones formed generative organs. In the subsequent spring-summer period, the process of micro- and macrosporogenesis was completed, pollination and seed development proceeded.

*Keywords:* somatic embryogenesis, plant regeneration, clones, genotyping, *Larix*

УДК 581.1

**ЭЛИСИТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДРОЖЖЕВОГО ЭКСТРАКТА НА  
НАКОПЛЕНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И АНТИРАДИКАЛЬНУЮ  
АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК *Linum grandiflorum* В УСЛОВИЯХ *in vitro***

© 2022 г. Е. А. Гончарук\*, @, О. Л. Сайбель\*\*, Г. П. Зайцев\*\*\*, Н. В. Загоскина\*, @@

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

\*\*ФГБУН ВНИИ лекарственных и ароматических растений, ул. Грина, 7, Москва, 117216 Россия

\*\*\*ФГБУН ВНИИ виноградарства и виноделия “МАГАРАЧ” РАН, ул. Кирова, 31, Ялта, 298600 Россия

@E-mail: goncharuk.ewgenia@yandex.ru

@@E-mail: zagoskina@ifr.moscow

Поступила в редакцию 29.04.2022 г.

После доработки 13.05.2022 г.

Принята к публикации 16.05.2022 г.

Изучено элиситорное действие различных концентраций дрожжевого экстракта (ДЭ, 200–1000 мг/л) на накопление фенольных соединений (ФС) и антирадикальную активность *in vitro* культуры льна крупноцветкового (*Linum grandiflorum* Desf.). Установлено повышение в ней суммарного содержания ФС и содержания фенилпропаноидов, особенно при высоких концентрациях ДЭ в среде (500 и 1000 мг/л). Антирадикальная активность экстрактов культур льна в большинстве случаев сохранялась на уровне контроля. Следовательно, элиситация *in vitro* культур льна крупноцветкового ДЭ сопровождалась активацией биосинтеза ФС, что способствовало накоплению этих вторичных метаболитов на фоне сохранения антирадикальной активности, получаемых из них экстрактов относительно контроля.

**Ключевые слова:** лен крупноцветковый, *Linum grandiflorum*, каллусная культура, элиситация, дрожжевой экстракт, фенольные соединения, антирадикальная активность

**DOI:** 10.31857/S1026347022060063

Одним из активно развиваемых направлений биологии является изучение действия различных элиситоров на растения (*in vitro* культуры клеток и тканей), что позволяет регулировать их генетический и продукционный потенциал, в том числе накопление специализированных (вторичных) метаболитов с фармакологически ценными свойствами (Тарчевский, 2002; Naik, Al-Khayri, 2016; Jamiołkowska, 2020). Механизм элиситации достаточно сложен и включает трансдукцию сигнала в клетки растений, в том числе при участии небольших молекул-мессенджеров: пероксида водорода, окиси азота, олигосахаридов, различных низкомолекулярных соединений (Тарчевский, 2002; Ramirez-Estrada *et al.*, 2016). Мажорными факторами, определяющими эффективность этого процесса, являются тип элиситора, его концентрация, длительность воздействия и способ применения (Narayani, Srivastava, 2017; Naskar *et al.*, 2021).

Согласно современным данным, элиситоры подразделяются на биотические, абиотические, эндогенные, экзогенные, общие и специфические (Jamiołkowska, 2020). Биотические элиситоры имеют ряд преимуществ перед абиотическими элиситорами и применяются, как правило, для

оптимизации фитохимического состава растений (Kannoja *et al.*, 2019). К их числу относится дрожжевой экстракт (ДЭ), представляющий собой комплекс соединений, благотворно влияющих на рост, продуктивность, микроэлементный состав, содержание фитогормонов и других растительных метаболитов (Naik, Al-Khayri, 2016; Halder *et al.*, 2019).

Одним из наиболее ранних “ответов” растительных клеток на элиситацию является генерация активных форм кислорода (АФК), рассматриваемая как их универсальная неспецифическая реакция (Hasanuzzaman *et al.*, 2020). Ключевое положение в регуляции их количества принадлежит антиоксидантной системе, представленной высокомолекулярными и низкомолекулярными соединениями. Низкомолекулярные антиоксиданты рассматривают как вторую линию защиты клеток от АФК, что имеет важное значение при пониженном уровне высокомолекулярных антиоксидантов (Erb, Kliebenstein, 2020).

К низкомолекулярным антиоксидантам относятся фенольные соединения (ФС) – вторичные метаболиты растений, разнообразные по структу-

ре и химическим свойствам (Cheynier *et al.*, 2013; Wagay *et al.*, 2020). Их взаимодействие с АФК предотвращает/снижает свободнорадикальные процессы окисления, тем самым защищая клетки растений от их токсического действия (Kumar, Pandey, 2013). Антиоксидантные свойства растительных ФС сохраняются и при поступлении в организм человека, благодаря чему они успешно используются в фармакологии при лечении различных заболеваний (Tungmunnithum *et al.*, 2018).

Следует отметить, что с каждым годом растительное сырье становится все менее доступным по экологическим и геополитическим причинам (Nosov, 2012). Альтернативой традиционному агрономическому земледелию или сбору фармакологически ценных растений для промышленного получения вторичных метаболитов могут быть биотехнологические подходы, в том числе *in vitro* культуры клеток и тканей (Naik, Al-Khayri, 2016; Hidalgo *et al.*, 2018). Их использование позволяет оптимизировать рост и продуктивность растительных клеток, а также автоматизировать эти процессы. Важен и тот факт, что культуры *in vitro* обладают “метаболической состоятельностью” в большей степени, чем растения (Nosov, 2012). Разработки в этой области предполагают получение высокопродуктивных клеточных линий, иммобилизацию и пермеабиллизацию клеток, биореакторную и метаболическую инженерию, а также элиситацию (Hidalgo *et al.*, 2018; Salem *et al.*, 2020). Последний из способов является привлекательной стратегией для повышения содержания вторичных метаболитов в клетках растений в тех случаях, когда другие – трудоемки и малоэффективны (Naik, Al-Khayri, 2016; Halder *et al.*, 2019).

К числу элиситоров, широко используемых при выращивании клеток растений в условиях *in vitro*, относится ДЭ (Ramirez-Estrada *et al.*, 2016; Narayani, Srivastava, 2017). При его воздействии отмечалось значительное увеличение содержания ФС в каллусной культуре *Zingiber officinale* (Ali *et al.*, 2018), в культуре бородатых корней *Polygonum multiflorum* (Ho *et al.*, 2018), а также в каллусных и суспензионных культурах, инициированных из других растений (El-Nabarawy *et al.*, 2015; Bhaskar *et al.*, 2022).

Высокая биологическая и антиоксидантная активность большинства растительных ФС ставит задачу расширения видового разнообразия культур, способных к их накоплению в условиях *in vitro*. К числу перспективных в этом отношении растений относятся представители рода *Linum*, насчитывающего более 200 распространенных по всему миру видов (Cullis, 2019). Для них характерно быстрое онтогенетическое развитие, а также использование в качестве коммерчески важной масличной, лубяной, лекарственной культуры (Горшкова, 2007; Zuk *et al.*, 2015). Одним из их представителей яв-

ляется лен крупноцветковый (*Linum grandiflorum* Desf.) – декоративное и лекарственное растение (Asad *et al.*, 2021). Его экстракты обладают широким спектром противовирусной и антибактериальной активности, способностью ингибировать ферменты класса гидролаз бактериальных клеток (тирозинкиназу, фосфордиэстеразу), а также HIV транскриптазу (обратную транскриптазу вируса иммунодефицита) (Mohammed *et al.*, 2010). Для льна крупноцветкового характерно образование различных фенольных соединений (ФС), в том числе флавонов и их гликозидов (лютеолин, глюколютеолин, виценин) с гипотензивными и противовоспалительными свойствами (Kagurppusamy, 2009; Alamgir, 2017). К ценным биологически активным соединениям, продуцентом которых является *L. grandiflorum*, относятся соединения класса лигнанов (подофиллотоксин и его производные – деоксиподофиллотоксин и метоксиподофиллотоксин), обладающие высокой антиканцерогенной, цитотоксической и противовирусной активностью, получение которых из других культур сопряжено с трудностями (Asad *et al.*, 2021).

В связи с малочисленностью работ по элиситации каллусной культуры льна крупноцветкового веществами биотической природы, целью исследования являлось изучение регуляции накопления в ней фенольных соединений при действии дрожжевого экстракта, а также оценка антирадикальной активности этанольных экстрактов, полученных из *in vitro* культуры *L. grandiflorum*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования была каллусная культура льна крупноцветкового (*L. grandiflorum* Desf.), инициированная из гипокотилей молодых проростков. Ее выращивали при +24°C и 16-час. фотопериоде (5000 люкс) в камере фитотрона ИФР РАН на питательной среде Гамборга, содержащей 2 мг/л 2,4-дихлофеноксисукусной кислоты. Длительность пассажа составляла 30 сут.

При проведении опытов каллусы 15-дневного возраста (середина линейной фазы роста) переносили на питательные среды, содержащие помимо основных компонентов различные концентрации ДЭ (200, 500 или 1000 мг/л). В качестве контроля использовали основную питательную среду. Каллусные культуры анализировали через 1 и 7 сут после начала элиситации. Для биохимических исследований их фиксировали жидким азотом и хранили при –70°C.

Оводненность каллусов анализировали после их высушивания до постоянного веса при +70°C (Рогожин, Рогожина, 2013).

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по содержанию малонового диальдегида (МДА), образуемого в реакции с тиобарбиту-

ровой кислотой (ТБК) (Радюкина и др., 2011). Навеску замороженного растительного материала гомогенизировали в 0.1 М трис-НСI-буфере (рН 7.5), содержащем 0.35 М NaCl, после чего добавляли 1 мл 0.5%-ного раствора ТБК в 20%-ном водном растворе трихлоруксусной кислоты. Реакционную смесь выдерживали в течение 30 мин на водяной бане (+100°C). Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре при 532 нм. Для расчета содержания МДА (мкмоль/г сырой массы) использовали коэффициент молярной экстинкции ( $1.56 \times 10^{-5} \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$ ).

ФС извлекали из замороженного в жидком азоте и измельченного растительного материала 96%-ным этанолом в течение 45 мин при +45°C. Экстракты центрифугировали (13500 g, 10 мин) и надосадочную жидкость использовали для спектрофотометрического определения содержания суммы ФС (реактив Фолина–Дениса) и содержания фенилпропаноидов (прямое спектрофотометрирование раствора) (Олениченко, Загоскина, 2005; Оленников, Танхаева 2011). Содержание суммы ФС выражали в мг-экв. рутина/г сухой массы, а содержание фенилпропаноидов – в мг-экв. кофейной кислоты/г сухой массы.

Антирадикальную активность этанольных экстрактов каллусных культур льна определяли спектрофотометрическим методом, основанным на способности ФС ингибировать предварительного генерируемые в модельных условиях *in vitro* супероксид и ОН<sup>•</sup> (Волкова и др., 2011). Для этого использовали реакционную смесь, в состав которой входили метионин, рибофлавин, нитро-синий тетразолий, экстракт (опытный вариант) или экстрагент (контроль), анализируя в ней количество формазана при 560 нм. Антирадикальную активность рассчитывали в % ингибирования супероксида по формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = 100 \times (1 - A_2/A_1),$$

где  $A_1$  – оптическая плотность формазана при длине волны 560 нм без добавления экстракта,  $A_2$  – оптическая плотность формазана после добавления экстракта.

Спектры поглощения этанольных экстрактов каллусных культур льна измеряли на спектрофотометре “Specord 40” (Германия) в пределах длин волн 250–350 нм.

Наличие 6-метоксиподофиллотоксина в этанольных экстрактах каллусных культур льна анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием системы Agilent Technologies (модель 1100) (Kubyshkin *et al.*, 2018). Хроматограф укомплектован проточным вакуумным дегазатором G1379A, 4-х канальным насосом градиента низкого давления G1311A, автоматическим инжектором G1313A, термостатом колонок G13116A, диодноматричным

детектором G1316A и флуоресцентным детектором G1315B.

Для разделения ФС применяли хроматографическую колонку “ZORBAX” SB-C18 (2.1 × 150 мм), заполненную силикагелем с привитой октадецилсилильной фазой зернением 3.5 мкм. Состав элюента: раствор А – метанол, раствор В – 0.6%-ный водный раствор трифторуксусной кислоты. Хроматографирование проводили в градиентном режиме. Состав элюента изменялся по следующей схеме (по содержанию компонента В): 0 мин – 8%; 0 – 8 мин – 8 – 38%; 8 – 24 мин – 38 – 100%; 24 – 30 мин – 100%. Скорость потока элюента – 0.25 мл/мин. Объем вводимой пробы – 1 мкл. Хроматограммы регистрировали при 280 нм. Идентификацию 6-метоксиподофиллотоксина производили путем сравнения его спектральных характеристик и времени удерживания с аналогичными характеристиками стандарта.

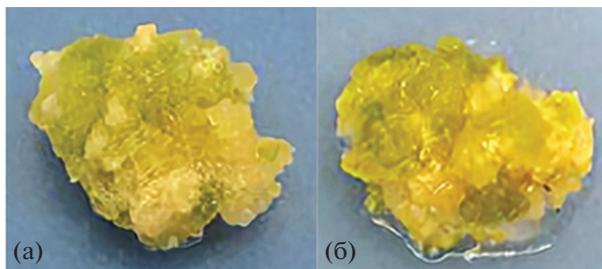
Статистическую обработку данных проводили по общепринятым методикам с использованием программ статистического пакета Excel (MS Office 2007). В экспериментах использовали трехкратные биологические и трех-четырёхкратные аналитические повторности измерений. На диаграммах представлены средние арифметические значения полученных величин и их стандартные ошибки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

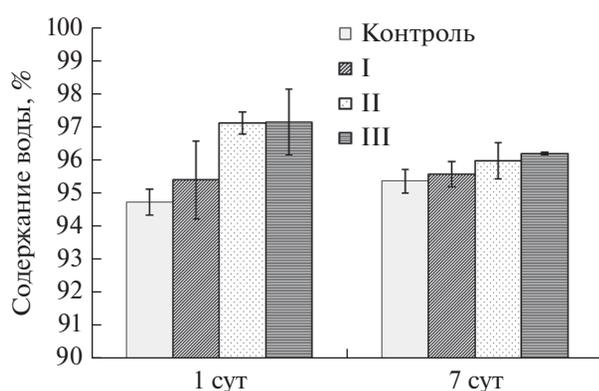
**Морфологические характеристики каллусной культуры льна крупноцветкового.** Каллусные культуры льна крупноцветкового контрольных и опытных вариантов были средней плотности, желто-зеленого цвета и состояли из крупноагрегированных клеточных конгломератов (рис. 1). Наличие зеленой окраски свидетельствовало о формировании хлорофилл-содержащих клеток на поверхности каллусов. Для всех культур характерна низкая скорость роста: прирост биомассы к концу пассажа в среднем составлял  $220 \pm 20\%$ .

Определение содержания воды, как важного физиологического показателя культур *in vitro*, показало, что после 1 сут элиситации оно сохранялось на уровне контроля при низком количестве ДЭ в среде (200 мг/л) и повышалось в равной степени на средах с высоким его количеством (500 и 1000 мг/л) (рис. 2). При более длительном периоде элиситации (7 сут) во всех вариантах оно было аналогично таковому контролю. По всей видимости, в начальный период действия ДЭ происходила инициация процессов растяжения и вакуолизации клеток льна и этот процесс был концентрационно зависимым, что отмечалось и другими исследователями (Farjaminezhad, Garoosi, 2021).

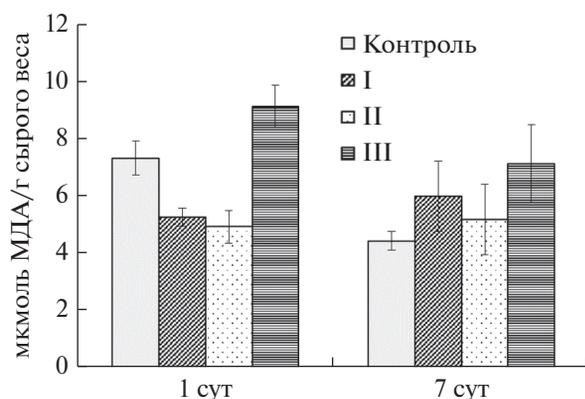
**Содержание малонового диальдегида в каллусной культуре льна крупноцветкового.** Для жизнедеятельности растительных клеток, в том числе



**Рис. 1.** Внешний вид каллусных культур *Linum grandiflorum*, выращиваемых на основной питательной среде (а) или на среде с дрожжевым экстрактом (500 мг/л; б). Возраст каллусов – 22 дня.



**Рис. 2.** Оводненность каллусных культур *Linum grandiflorum*, подвергнутых кратковременной (1 сут) и длительной (7 сут) элиситации различными концентрациями дрожжевого экстракта (I, II, III – 200, 500 и 1000 мг/л соответственно). Контроль – отсутствие элиситора.



**Рис. 3.** Содержание малонового диальдегида (МДА) в каллусных культурах *Linum grandiflorum*, подвергнутых кратковременной (1 сут) и длительной (7 сут) элиситации различными концентрациями дрожжевого экстракта (I, II, III – 200, 500 и 1000 мг/л соответственно). Контроль – отсутствие элиситора.

при действии различных факторов, большое значение имеет их редокс-гомеостаз, обусловленный равновесием между образованием и деструкцией АФК (Hasanuzzaman *et al.*, 2020). Важным критерием этого процесса служит уровень ПОЛ, оцениваемый по содержанию МДА (Колупаев и др., 2019). После 1 сут элиситации в каллусах льна, выращиваемых на средах с 200 и 500 мг/л ДЭ, оно было равным и на 30% ниже значения контроля (рис. 3). Иная тенденция отмечалась при действии высокой концентрации ДЭ (1000 мг/л): уровень ПОЛ превышал таковой контроля на 25%. Следовательно, кратковременное воздействие элиситора на клетки льна в условиях *in vitro* приводило к изменениям в функционировании антиоксидантной системы. Это проявлялось как в снижении (низкие концентрации ДЭ), так и в увеличении (высокая концентрация ДЭ) уровня ПОЛ в каллусах опытных вариантов. О том, что условия элиситации приводят к изменениям количества АФК в клетках растений, сообщалось и другими авторами (Ali *et al.*, 2018; Hasanuzzaman *et al.*, 2020).

Интересен факт более низкого уровня ПОЛ (на 30%) в каллусах льна контрольного и одного из опытных вариантов (1000 мг/л ДЭ) в период завершения эксперимента (7 сут) по сравнению с его началом (1 сут). По всей видимости, это связано с уменьшением в них количества АФК и нормализацией баланса про/антиоксидантной активности (Naik, Al-Khayri, 2016; Колупаев и др., 2019). В целом после длительного воздействия ДЭ (7 сут) во всех вариантах количество МДА превышало таковое контроля, хотя достоверные отличия (на 40%) характерны только для его высокой концентрации в среде (1000 мг/л).

Известно, что процесс элиситации клеток растений зависит как от концентрации вещества, так и от длительности его воздействия (Тарчевский, 2002; Makowski *et al.*, 2020). Исходя из наших данных можно предположить, что кратковременное действие высокой концентрацией ДЭ (1000 мг/л, 1 сут) предположительно приводило к активации образования АФК у культивируемых *in vitro* клеток льна, в отличие от эффекта действия более низких его концентраций (200 и 500 мг/л), при которых уровень ПОЛ в них снижался за счет изменений про/антиоксидантного равновесия (Naskar *et al.*, 2021). При более длительном периоде элиситации (7 сут) содержание МДА в каллусах льна возрастало относительно контроля, что, по-видимому, обусловлено избыточным образованием АФК и нарушением окислительно-восстановительного баланса. Это согласуется с данными других авторов об отличиях в ответной реакции растительных клеток на длительность действия элиситоров и их концентрации (Makowski *et al.*, 2020; Farjaminezhad, Garoosi, 2021).

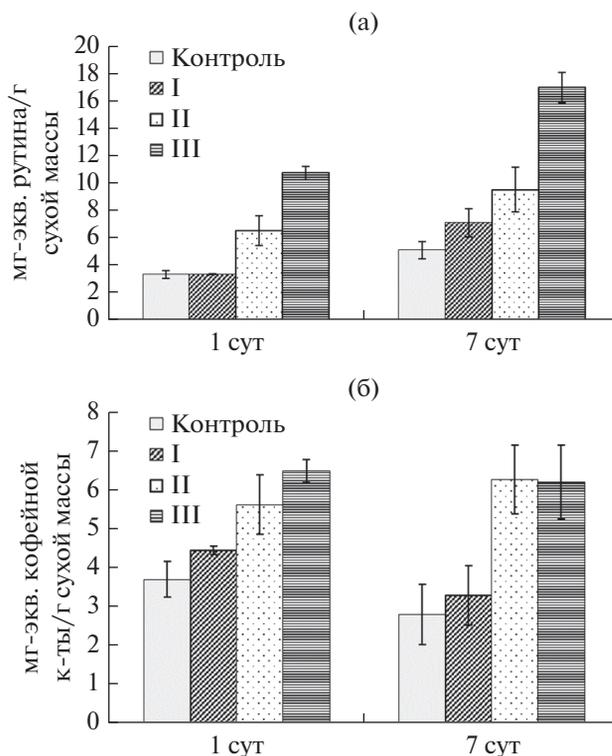
**Содержание фенольных соединений в каллусной культуре льна крупноцветкового.** К числу эффективных антиоксидантов относятся различные ФС, образование которых характерно для всех клеток и тканей растений (Kagurpusamy, 2009). Их биосинтез является отличительной чертой различных растений рода *Linum*, в том числе и льна крупноцветкового (Tchoumtchoua *et al.*, 2019; Asad *et al.*, 2021).

Определение суммарного содержания ФС позволяет установить вклад этих низкомолекулярных антиоксидантов в формирование ответных реакций растительных клеток на действие изучаемого фактора (Kagurpusamy, 2009). Как следует из представленных на рис. 4а данных, наиболее низкое их количество было в культуре льна, подвергнутого кратковременному действию (1 сут) низкой концентрацией ДЭ (200 мг/л), равное таковому контрольного варианта. При более высоких концентрациях элиситора в среде, содержание ФС значительно возрастало (в 2 и 3 раза соответственно при 500 и 1000 мг/л ДЭ). Исходя из этих данных, можно заключить, что кратковременное воздействие ДЭ способствовало накоплению ФС в каллусных культурах льна крупноцветкового.

При длительном действии элиситора (7 сут) тенденции в определенной степени были аналогичными: возрастание суммарного содержания ФС в культурах практически на 200 и 300% по сравнению с контролем в присутствии 500 и 1000 мг/л ДЭ в среде, соответственно. Кроме того, увеличение их количества отмечалось и при действии 200 мг/л ДЭ, но в значительно меньшей степени (на 35% относительно контроля).

Полученные нами результаты согласуются с немногочисленными данными других исследователей о стимулирующем влиянии элиситоров биотической природы на накопление ФС у каллусов, полученных из различных видов растений (El-Nabarawy *et al.*, 2015; Bhaskar *et al.*, 2022). Отмечалась концентрационная и экспозиционная зависимость содержания этих метаболитов при элиситации культур *in vitro* (Ali *et al.*, 2018; Nunes da Silva *et al.*, 2021). Имеются сведения о том, что некоторые элиситоры способствовали не только увеличению количества ФС, в том числе флавоноидов, но и одновременному снижению их жизнеспособности, что влечет замедление роста и гибель клеток (Jesionek *et al.*, 2018). В частности, стратегия индуцирования биосинтеза такого противоопухолевого соединения, как паклитаксел в суспензионных культурах тиса сопровождалась замедлением их роста, что значительно затрудняло использование элиситации для крупномасштабной обработки (Salem *et al.*, 2020).

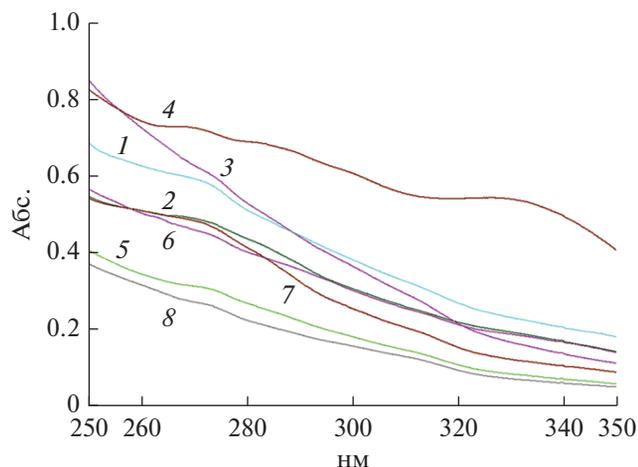
**Содержание фенилпропаноидов в каллусной культуре льна крупноцветкового.** Важным показателем ответа растительных клеток на элиситацию



**Рис. 4.** Содержание суммы фенольных соединений (а) и фенилпропаноидов (б) в каллусных культурах *Linum grandiflorum*, подвергнутых кратковременной (1 сут) и длительной (7 сут) элиситации различными концентрациями дрожжевого экстракта (I, II, III – 200, 500 и 1000 мг/л, соответственно). Контроль – отсутствие элиситора.

может быть изменение накопления фенилпропаноидов как наиболее простых соединений из ряда специализированных фенольных метаболитов, образование которых характерно для льна (Волынец, 2013). Определение их содержания в контрольных вариантах каллусных культур льна показало, что в начальный период исследования (1 сут) оно было на 30% выше, чем в конце (7 сут) (рис. 4б). Это может быть обусловлено изменениями в их образовании в течение пассажа, как это отмечалось и другими авторами (Asad *et al.*, 2021).

Элиситация каллусных культур льна сопровождалась накоплением в них фенилпропаноидов и этот эффект зависел от концентрации ДЭ в питательной среде и длительности его воздействия. Количество этих фенольных метаболитов повышалось после кратковременного воздействия (1 сут) 200, 500 и 1000 мг/л ДЭ на 20, 50 и 175% соответственно, по сравнению с контролем. Следовательно, чем выше была концентрация элиситора в питательной среде, тем в большей степени увеличивалось содержание фенилпропаноидов в каллусах льна. Это согласуется с данными других авторов о прямой корреляционной зависимости между концентрацией действующего экзогенного фак-



**Рис. 5.** УФ-спектры поглощения этанольных экстрактов из каллусных культур *Linum grandiflorum*, после кратковременной (1 сут; варианты 1–4) и длительной (7 сут; варианты 5–8) элиситации различными концентрациями дрожжевого экстракта (200 мг/л – варианты 2, 6; 500 мг/л – варианты 3, 7; 1000 мг/л – варианты 4, 8). Контроль – отсутствие элиситора (варианты 1, 5).

тора и ответной реакцией клеток на уровне накопления в них ФС (Ali *et al.*, 2018; Halder *et al.*, 2019; Makowski *et al.*, 2020).

Сравнение содержания фенилпропаноидов в каллусах льна после длительной элиситации (7 сут) также свидетельствует о более высоком их накоплении в опытных вариантах по сравнению с контролем, что наиболее выражено при действии высоких концентраций ДЭ (500 и 1000 мг/л). При этом оно было равным таковому предыдущего периода исследования (1 сут воздействия).

Исходя из полученных данных можно предположить, что активация биосинтеза фенилпропаноидов характерна преимущественно для начальных этапов элиситации *in vitro* культур льна. Так, при кратковременном воздействии на них элиситора накопление этих ФС зависело от его действующей концентрации и было наибольшим при высоких дозах, тогда как в дальнейшем активации этого процесса уже не происходило. О повышении содержания фенилпропаноидов и увеличении экспрессии генов фенилпропаноидного пути при экзогенной обработке растительных культур *in vitro* биотическими элиситорами, представленными полисахаридами (в том числе ДЭ), сообщалось в литературе. Это было характерно для некоторых представителей семейства Яснотковых и Бурачниковых, а также для такой ценной лекарственной культуры, как зверобой продырявленный (Park *et al.* 2016; Shakya *et al.*, 2019). Все это может свидетельствовать о регуляторной роли фенилпропаноидов, для которых характерна высокая

радикал-связывающая способность, в поддержании редокс-гомеостаза в растительных клетках.

**О фенольных соединениях и лигнанах в каллусных культурах льна крупноцветкового.** Изучение состава ФС и его изменений при экзогенных воздействиях является важным показателем метаболической активности растительных клеток и тканей (Cheynier *et al.*, 2013). В первую очередь были проведены исследования спектров поглощения этанольных экстрактов каллусных культур льна крупноцветкового, что позволяет провести оценку наличия в них определенных метаболитов. В нашем случае был использован интервал длин волн от 250 до 350 нм, где регистрируются основные и дополнительные максимумы поглощения большинства ФС (Вольнец, 2013). Во всех случаях в этанольных экстрактах каллусов льна крупноцветкового отмечен максимум поглощения при 260 нм (рис. 5). Это соответствует основному максимуму поглощения оксибензойных кислот (235–270 нм). При других длинах волн четко выраженных максимумов в УФ области не наблюдалось, что может быть следствием низкой концентрации ФС в этанольных экстрактах каллусных культур, хотя иногда присутствовал дополнительный максимум при 330 нм. Все это подтверждает наличие в них соединений фенилпропаноидной природы, представленных конъюгатами *n*-оксибензойной, *n*-кумаровой, феруловой и кофейной кислот, как это отмечалось нами ранее (Гончарук и др., 2018). Следует также отметить значительное сходство УФ-спектров экстрактов всех исследованных вариантов каллусных культур льна крупноцветкового, что может свидетельствовать о сходстве состава их фенольных комплексов. Об отсутствии различий в фенольном комплексе *in vitro* культур растительных клеток, в том числе подвергнутых действию различных экзогенных факторов, сообщалось в литературе (Ossipov *et al.*, 2022). Судя по спектрам поглощения экстрактов, полученных из каллусных культур льна различных вариантов, содержание ФС в них было различным, что согласуется с данными по их количественному определению (рис. 4).

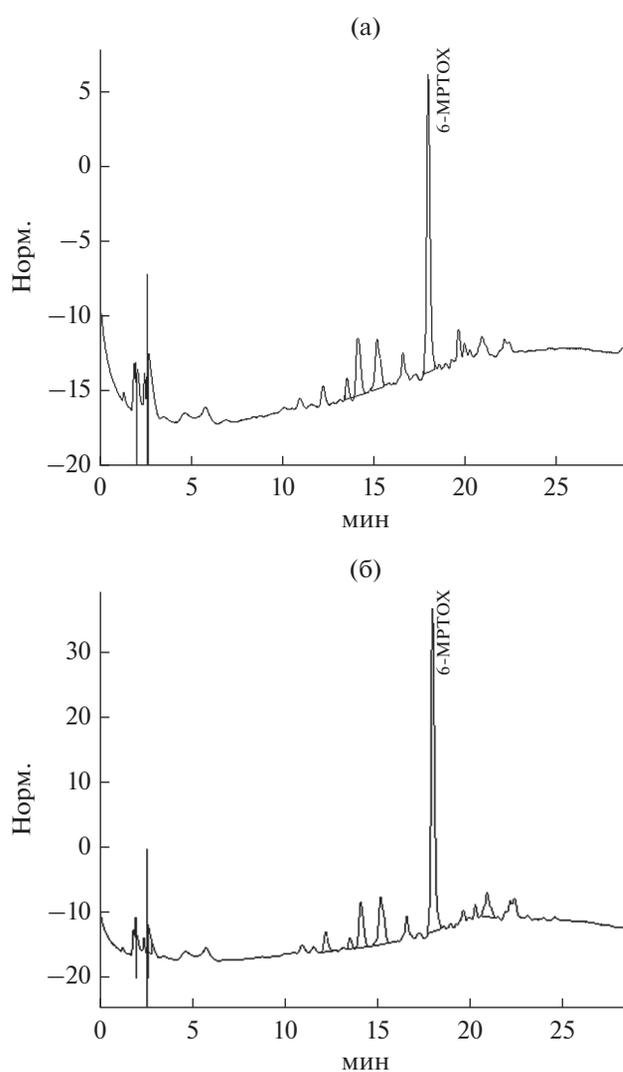
Одними из важных и фармакологически ценных метаболитов растений льна являются лигнаны, представляющие собой димерные фенилпропаноиды и рассматриваемые как первичные антиоксиданты, нейтрализующие свободные радикалы (Mohammed *et al.*, 2010; Alamgir *et al.*, 2017). Сообщалось о накоплении этих соединений в фотомиксотрофных каллусных культурах льна, а также о стимулирующем действии элиситации на их образование (Karuppusamy, 2009; Naik, Al-Khayri, 2016).

В большинстве литературных источников сообщалось об образовании в растениях льна, в том числе льна крупноцветкового, таких лигнанов, как

подофиллотоксин, деоксиподофиллотоксин и 6-метоксиподофиллотоксин (МРТОХ) (Mohammed *et al.*, 2010). Использование ВЭЖХ хроматографии позволило установить наличие МРТОХ в этанольных экстрактах каллусных культур льна крупноцветкового (рис. 6). При этом его содержание было невысоким и достаточно близким во всех вариантах. Следовательно, для каллусных культур льна крупноцветкового характерен биосинтез 6-метоксиподофиллотоксина – производного фенилпропаноидного пути. О том, что в условиях *in vitro* клетки сохраняют способность к биосинтезу характерных для интактных тканей растений вторичных метаболитов неоднократно сообщалось в литературе (Nosov, 2012; Halder *et al.*, 2019).

Все вышеизложенное свидетельствует о том, что культивируемые *in vitro* клетки льна крупноцветкового сохраняли способность к накоплению ФС, в том числе лигнанов, характерных для интактного растения. При этом их состав не изменялся при действии элиситора, а количество – повышалось. Следовательно, элиситация клеток льна ДЭ позволяет регулировать их биосинтетическую активность в отношении накопления ФС, преимущественно фенилпропаноидов – биологически активных метаболитов с антиоксидантной активностью.

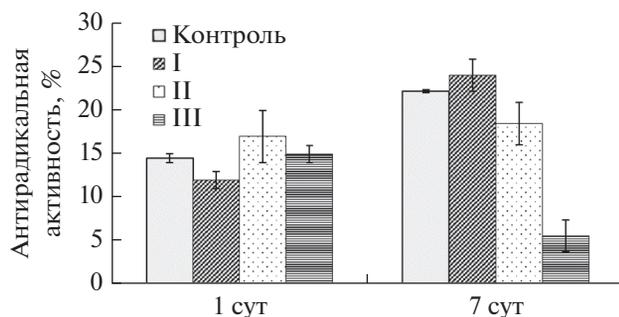
**Определение антирадикальных свойств экстрактов каллусных культур льна крупноцветкового.** Антирадикальная активность растительных экстрактов является одним из важных показателей, характеризующих возможность их практического применения в фармакологических целях (Mohammed *et al.*, 2010; Alamgir, 2017). Поскольку для ФС характерно ее проявление в отношении свободных радикалов, образующихся при действии внешних факторов различной природы, важно было сравнить антирадикальную активность растительных экстрактов каллусных культур льна крупноцветкового контрольных и опытных вариантов. Как следует из представленных на рис. 7 данных, при кратковременном действии ДЭ (1 сут) она имела близкие значения, и различия между ними были статистически недостоверны. После 7 сут элиситации в экстрактах культур льна контрольного варианта и варианта с действием 200 мг/л ДЭ антирадикальная активность была равной, наибольшей и на 50% превышала таковую более раннего периода элиситации (1 сут). В других вариантах она была ниже: на 17% в экстрактах каллусов на среде с 500 мг/л ДЭ и в 4.5 раза – на среде с 1000 мг/л ДЭ. Следовательно, применение данной стратегии элиситации каллусных культур льна крупноцветкового сопровождалось ингибированием антирадикальной активности их этанольных экстрактов (после 7 сут воздействия высокими концентрациями ДЭ) или же не оказывало влияния на изучаемый процесс (кратковременное воздействие ДЭ, 1 сут). Все это отражает многофункциональность действия



**Рис. 6.** ВЭЖХ-хроматограмма этанольного экстракта каллусной культуры льна крупноцветкового контрольного (а) и опытного (действие 500 мг/л дрожжевого экстракта; б) (регистрация при 280 нм). По оси ординат представлены данные mAU, по оси абсцисс – время выхода соединения (мин). МРТОХ – 6-метоксиподофиллотоксин.

низкомолекулярных антиоксидантов и сложность оценки их вклада в антирадикальную активность экстрактов, получаемых из растительных объектов. О том, что содержание вторичных метаболитов фенольной природы в клетках и тканях растений не всегда коррелирует с антирадикальной и антиоксидантной активностью полученных из них экстрактов, сообщалось в литературе (Ali *et al.*, 2018).

Все вышеизложенное подтверждает положение о том, что потенциал получения специализированных метаболитов, в частности ФС, из *in vitro* культур клеток и тканей растений варьирует в зависимости от их типа, происхождения, параметров элиситации и внешних факторов. ДЭ, являясь



**Рис. 7.** Антирадикальная активность этанольных экстрактов каллусных культур *Linum grandiflorum*, подвергнутых кратковременной (1 сут) и длительной (7 сут) элиситации различными концентрациями дрожжевого экстракта (I, II, III – 200, 500 и 1000 мг/л соответственно). Контроль – отсутствие элиситора.

экологически безопасным соединением биотической природы, оказывает стимулирующий эффект в отношении образования соединений фенольной природы, однако его элиситорное действие во многом зависит от концентрации и длительности воздействия. Исходя из этих данных, можно заключить, что для оптимизации их образования в клеточных культурах растений и понимания регуляции биосинтеза в условиях элиситации необходимы дальнейшие транскриптомные, метаболомные и протеомные исследования, столь необходимые для решения как фундаментальных, так и прикладных задач получения уникальных растительных метаболитов с антиоксидантными свойствами.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (121050500047-5).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Волкова Л.А., Урманцева В.В., Бургутин А.Б., Маевская С.Н., Носов А.М. Стимулирование защитных реакций у растений картофеля *in vitro* с помощью стероидных гликозидов в условиях абиотического стресса // Физиология растений. 2011. Т. 58. С. 766–773.
- Вольнец А.П. Фенольные соединения в жизнедеятельности растений. Минск.: Беларусь, 2013. 283 с.
- Гончарук Е.А., Николаева Т.Н., Назаренко Л.В., Калашникова Е.А., Загоскина Н.В. Ответная реакция культивируемых *in vitro* клеток *Linum grandiflorum* Desf. на действие кадмия и глифосата // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53(5). С. 938–946.
- Горшкова Т.А. Растительная клеточная стенка как динамичная система. М.: Наука, 2007. 426 с.
- Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Кабашикова Л.Ф. Антиоксидантная система растений: клеточная компартментация, защитные и сигнальные функции, механизмы регуляции (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. №. 5. С. 419–440.
- Олениченко Н.А., Загоскина Н.В. Ответная реакция озимой пшеницы на действие низких температур: образование фенольных соединений и активность L-фенилаланин-аммиак-лиазы // Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 6. С. 681–685.
- Оленников Д.Н., Танхаева Л.М. Фенольные соединения листьев *Sacalia hastata* L. и их количественный анализ // Химия растительного сырья. 2011. № 3. С. 143–148.
- Радюкина Н.Л., Иванов Ю.В., Шевякова Н.И. Методы оценки содержания активных форм кислорода, низкомолекулярных антиоксидантов и активностей основных антиоксидантных ферментов // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. М.: БИОНОМ, 2011. С. 347–365.
- Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Практикум по физиологии и биохимии растений. СПб.: ГИОРД, 2013. 352 с.
- Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. 294 с.
- Alamgir A.N.M. Therapeutic use of medicinal plants and their extracts: volume 2. Springer International Publishing AG. 2017. 785 p.
- Ali A.M.A., El-Nour M.E.M., Yagi S.M. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) rhizome, callus and callus treated with some elicitors // J. Genetic Engin. Biotechn. 2018. V. 16(2). P. 677–682.
- Asad B., Khan T., Gul F.Z., Ullah M.A., Drouet S. Scarlet flax *Linum grandiflorum* (L.) *in vitro* cultures as a new source of antioxidant and anti-inflammatory lignans // Molecules. 2021. V. 26(15). P. 4511–4526.
- Bhaskar R., Spandhana L., Xavier E., Udayakumaran G., Kumar D.S., Venkatesh R., Nagella P. Biotic elicitors: A boon for the *in vitro* production of plant secondary metabolites // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2022. V. 149. P. 7–24.
- Cheyrier V., Comte G., Davies K.M., Lattanzio V., Martens S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology // Plant Physiology and Biochemistry. 2013. V. 72. P. 1–20.
- Cullis C.A. Fundamental insights into plant biology that might be offered by flax // Genetics and genomics of *Linum*. Springer, Cham. 2019. P. 261–263.
- El-Nabarawy M.A., El-Kafafi S.H., Hamza M.A., Omar M.A. The effect of some factors on stimulating the growth and production of some substances in *Zingiber officinalis* callus cultures // Ann. Agric. Sci. 2015. V. 60(1). P. 1–9.
- Erb M., Kliebenstein D.J. Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy // Plant Physiology. 2020. V. 184. № 1. P. 39–52.
- Farjaminezhad R., Garoosi G. Improvement and prediction of secondary metabolites production under yeast extract elicitation of *Azadirachta indica* cell suspension culture using response surface methodology // AMB Express. 2021. V. 11(1). P. 1–16.
- Halder M., Sarkar S., Jha S. Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites

- in hairy root cultures // *Engineering in Life Sciences*. 2019. V. 19(12). P. 880–895.
- Hasanuzzaman M, Borhannuddin Bhuyan M.H.M., Zulfiqar F, Raza A., Mohsin S.M., Al Mahmud J. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator // *Antioxidants*. 2020. V. 9(8). P. 681–733.
- Hidalgo D., Raul S., Liliana L., Mercedes B., Purificacion C., Javier P. Biotechnological production of pharmaceuticals and biopharmaceuticals in plant cell and organ cultures // *Current medicinal chemistry*. 2018. V. 25(30). P. 3577–3596.
- Ho T.T., Lee J.D., Jeong C.S., Paek K.Y., Park S.Y. Improvement of biosynthesis and accumulation of bioactive compounds by elicitation in adventitious root cultures of *Polygonum multiflorum* // *Applied microbiology and biotechnology*. 2018. V. 102(1). P. 199–209.
- Jamiołkowska A. Natural compounds as elicitors of plant resistance against diseases and new biocontrol strategies // *Agronomy*. 2020. V. 10(2). P. 173–184.
- Jesionek A., Kokotkiewicz A., Krolicka A., Zabiegala B., Maria L. Elicitation strategies for the improvement of essential oil content in *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) bioreactor-grown microshoots // *Industrial Crops and Products*. 2018. V. 123. P. 461–469.
- Kannoja P., Choudhary K.K., Srivastava A.K., Singh A.K. PGPR bioelicitors: induced systemic resistance (ISR) and proteomic perspective on biocontrol // *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture*. Woodhead Publishing, 2019. P. 67–84.
- Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures // *J. Medicinal Plants Res*. 2009. V. 3(13). P. 1222–1239.
- Kubyshekin A., Ogai Y., Fomochkina I., Chernousova, I., Zaitsev G., Shramko Y. Polyphenols of red grape wines and alcohol-free food concentrates in rehabilitation technologies // *Polyphenols*. Ed. Wong J. L. InTechOpen. 2018. P. 99–120.
- Kumar S., Pandey A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview // *Sci. World J*. 2013. V. 2013. P. 1–17.
- Makowski W., Tokarz K. M., Tokarz B., Banasiuk R., Witek K., Króllicka A. Elicitation-based method for increasing the production of antioxidant and bactericidal phenolic compounds in *Dionaea muscipula* J. Ellis tissue // *Molecules*. 2020. V. 25. P. 1794.
- Mohammed M.M.D., Chenc M., Zhaic L., Ibrahim N.A. The cytotoxic activity of *Linum grandiflorum* leaves // *European J. Chemistry*. 2010. V.1. P.110–114.
- Naik P. M., Al-Khayri J. M. Abiotic and biotic elicitors – role in secondary metabolites production through *in vitro* culture of medicinal plants // *Abiotic and biotic stress in plants – recent advances and future perspectives*. 2016. P. 247–277.
- Narayani M., Srivastava S. Elicitation: a stimulation of stress in *in vitro* plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production // *Phytochem. Rev*. 2017. V. 16. P. 1227–1252.
- Naskar S., Roy C., Ghosh S., Mukhopadhyay A., Hazarika L.K., Chaudhuri R.K., Roy S., Chakraborti D. Elicitation of biomolecules as host defense arsenals during insect attacks on tea plants (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) // *Appl. Microbiol. Biotech*. 2021. V. 105. P. 7187–7199.
- Nosov A.M. Application of cell technologies for production of plant-derived bioactive substances of plant origin // *Appl. Biochem. Microbiol*. 2012. V. 48. P. 609–624.
- Nunes da Silva M.N. Santos C.S, Cruz I A., López-Villamor A., Vasconcelos M.W. Chitosan increases *Pinus pinaster* tolerance to the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) by promoting plant antioxidative metabolism // *Scientific Reports*. 2021. V. 11(1). P. 1–10.
- Ossipov V, Zubova M., Nechaeva T, Zagoskina N., Salminen J.-P. The regulating effect of light on the content of flavan-3-ols and derivatives of hydroxybenzoic acids in the callus culture of the tea plant, *Camellia sinensis* L. // *Biochem. System. Ecology*. 2022. V. 101. P. 104383–104394.
- Park W.T., Arasu M.V., Al-Dhabi N.A 2, Yeo S.K., Jeon J., Park J.S. Yeast extract and silver nitrate induce the expression of phenylpropanoid biosynthetic genes and induce the accumulation of rosmarinic acid in *Agastache rugosa* cell culture // *Molecules*. 2016. V. 21(4). P. 426–439.
- Ramirez-Estrada K., Vidal-Limon H., Hidalgo D., Moyano E., Golenioski M., Cusidó R.M., Palazon J. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories // *Molecules*. 2016. V. 21. P. 182–206.
- Salem M.A., de Souza L.P., Serag A., Fernie A.R., Farag M.A., Ezzat Sh.M., Alseekh S. Metabolomics in the context of plant natural products research: From sample preparation to metabolite analysis // *Metabolites*. 2020. V. 10. P. 37–67.
- Shakya P., Marslin G., Siram K., Beerhues L., Franklin G. Elicitation as a tool to improve the profiles of high value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum* // *J. Pharm. Pharmacol*. 2019. V. 71. P. 70–82.
- Tchoumtchoua J., Mathiron D., Pontarin N., Gagneul D., van Bohemen A. Phenolic profiling of flax highlights contrasting patterns in winter and spring varieties // *Molecules*. 2019. V. 24. P. 4303–4317.
- Tungmunnithum D., Thongboonyou A., Pholboon A., Yangsai A. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: an overview // *Medicines*. 2018. V. 5. P. 93. <https://doi.org/10.3390/medicines5030093>
- Wagay N.A., Lone R., Rafiq S., Bashir S.U. Phenolics: a game changer in the life cycle of plants // *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture*. Singapore: Springer., 2020. P. 241–275.
- Zuk M., Richter D., Matuła J., Szopa J. Linseed, the multipurpose plant // *Industrial Crops and Products*. 2015. V. 75. P. 165–177.

## Elicitor Effect of Yeast Extract on the Accumulation of Phenolic Compounds and Antiradical Activity of *Linum grandiflorum* Cells *in vitro*

E. A. Goncharuk<sup>1, #</sup>, O. L. Saibel<sup>2</sup>, G. P. Zaitsev<sup>3</sup>, and N. V. Zagoskina<sup>1, ##</sup>

<sup>1</sup> Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, ul. Botanicheskaya 35, Moscow, 127276 Russia

<sup>2</sup> FGBUN All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, st. Grina, 7, Moscow, 117216 Russia

<sup>3</sup> FGBUN All-Russian Research Institute of Viticulture and Winemaking "MAGARACH" RAS, st. Kirova, 31, Yalta, 298600 Russia

<sup>#</sup>e-mail: goncharuk.ewgenia@yandex.ru

<sup>##</sup>e-mail: zagoskina@ifr.moscow

The elicitor effect of yeast extract (YE, 200–000 mg/L) on the phenolic compounds (PC) accumulation and antiradical activity of *in vitro* large-flowered flax culture (*Linum grandiflorum* Desf.) was studied. It was found that the total content of PC and the content of phenylpropanoids were increased in it, especially at high concentrations of YE in the medium (500 and 1000 mg/L). The antiradical activity of flax culture extracts remained at the control level in most cases. Thus, *in vitro* elicitation of large-flowered YE flax cultures was accompanied by the activation of PC biosynthesis, which led to these secondary metabolites accumulation of while maintaining the antiradical activity control variants extracts.

**Keywords:** large-flowered flax, *Linum grandiflorum*, callus culture, elicitation, yeast extract, phenolic compounds, antiradical activity

ФИЗИОЛОГИЯ  
РАСТЕНИЙ

УДК 581.1

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ОКСИДАЗЫ  
МИТОХОНДРИЙ *Lupinus luteus* И ВЛИЯНИЕ НА ИХ ЭКСПРЕССИЮ  
САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

© 2022 г. П. А. Буцанец\*, @, Н. А. Шугаева\*, А. Г. Шугаев\*

\*ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276 Россия  
@E-mail: p.corbeau@list.ru

Поступила в редакцию 28.02.2022 г.

После доработки 27.04.2022 г.

Принята к публикации 27.04.2022 г.

Исследовано влияние стрессового фитогормона – салициловой кислоты (СК) на изменения активности альтернативного пути дыхания и экспрессию генов альтернативной оксидазы митохондрий в семядолях этиолированных проростков люпина (*Lupinus luteus* L.). Обнаружено, что у *L. luteus* имеются минимум 3 ядерных гена двух подсемейств (*AOX1a*, *AOX1d* и *AOX2*), кодирующих различные изоформы белка альтернативной оксидазы. Выявлена активация СК альтернативного пути окисления в митохондриях и накопление транскриптов двух генов альтернативной оксидазы (*AOX1a* и *AOX2*). Экспрессия генов зависела от концентрации фитогормона. При 0.5 мМ концентрации фитогормона увеличивалось содержание мРНК гена *AOX2*, а при 1 мМ происходило накопление *de novo* транскриптов гена *AOX1a*.

**Ключевые слова:** *Lupinus luteus*, семядоли, митохондрии, альтернативная оксидаза, экспрессия генов

**DOI:** 10.31857/S102634702206004X

Известно, что в дыхательной цепи митохондрий растений функционируют две различные терминальные оксидазы: цитохромоксидаза (ЦО) и CN-резистентная альтернативная оксидаза (АОХ), шунтирующая основную дыхательную цепь на уровне пула убихинона и переносящая электроны непосредственно на кислород в обход двух пунктов энергетического сопряжения (второго и третьего; Шугаев, 1999; Millar *et al.*, 2011). При этом большая часть энергии, выделяемой при окислении дыхательных субстратов, не используется на синтез АТФ, а расходуется в виде тепла. Показано, что активация АОХ в неблагоприятных условиях, а также при ингибировании работы ЭТЦ (например, при действии цианида, антимицина А и других ингибиторов дыхания) способствует снижению скорости образования активных форм кислорода (АФК) основной дыхательной цепью благодаря уменьшению степени восстановленности ее переносчиков электронов (Maxwell *et al.*, 2002; Грабельных и др., 2011).

АОХ кодируется ядерными генами двух подсемейств: *AOX1* и *AOX2* (Considine *et al.*, 2001; Millar *et al.*, 2011). Экспрессия генов семейства *AOX1*, особенно *AOX1a*, и последующая активация нефосфорилирующего альтернативного пути окисления (АП) в дыхательной цепи митохондрий повышается в стрессовых условиях (Clifton *et al.*,

2006; Macherel *et al.*, 2007). Наоборот, до недавнего времени считалось, что *AOX2* является конститутивным геном и его экспрессия не активируется в условиях стресса, однако наблюдается на отдельных этапах роста и развития растений, в частности, на начальном этапе прорастания семян *Arabidopsis thaliana* (Considine *et al.*, 2001; Clifton *et al.*, 2006; Macherel *et al.*, 2007). Тем не менее, при прорастании семян *Vigna unguiculata* L. (семейство *Fabaceae*, к которому относится и *Lupinus luteus*), в условиях низкой температуры, а также в присутствии салициловой кислоты (СК) или H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, активировалась экспрессия не только гена *AOX1a*, но и *AOX2*, хотя в разные временные периоды (Costa *et al.*, 2010). Авторы предположили, что экспрессия гена *AOX2b* имеет двойную природу: конститутивную и индуцибельную. В этом отношении интересны последние данные, свидетельствующие, что промоторы всех генов АОХ арабидопсиса содержат стресс-чувствительные *cis*-регуляторные элементы (Garmash *et al.*, 2020). Предполагается, что экспрессия генов АОХ регулируется, как со стороны митохондрий (O<sup>-</sup>, перекись водорода, цитрат, а также CN<sup>-</sup> и другие ингибиторы цитохромного пути окисления), так и со стороны клетки, в которой прямо или опосредовано участвуют фитогормоны АБК, СК и этилен (Vanlerberghe, 2013). Молекулярная природа этих сигнальных путей

пока изучена слабо, тем не менее, в промоторе гена *AOX1a* *A. thaliana* идентифицирована область митохондриальной ретроградной регуляции (МРР) его экспрессии (Dojcinovic *et al.*, 2005), а также обнаружено 10 *cis*-активирующих регуляторных элементов чувствительных к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и ротенону, но нечувствительных к СК (Ho *et al.*, 2008). К настоящему времени накоплены убедительные доказательства роли митохондриальных АФК в активации экспрессии генов АОХ, в частности, *AOX1a* (Vanlerberghe *et al.*, 2020). Кроме того, экспрессия генов АОХ может регулироваться многими другими эффекторами, например, интермедиатами трикарбонового цикла, а также редокс-состоянием митохондрий и хлоропластов, на которые СК также оказывает существенное влияние (Selinski *et al.*, 2018; Van Aken 2021).

Салициловая кислота (СК) — фитогормон, оказывающий регуляторное воздействие на многие физиологические процессы: прорастание семян, цветение, старение листьев, дыхание, фотосинтез и другие (Vlot *et al.*, 2009; Rivas-San Vicente, Plasencia, 2011; Maruri-López *et al.*, 2019). Однако доказана и детально изучена функциональная роль СК только в процессе индукции термогенеза при цветении ароидных, у которых фитогормон регулирует этот процесс через активацию экспрессии генов АОХ и многократное увеличение активности АОХ в митохондриях початков (Raskin *et al.*, 1987). Ранее было показано, в том числе и в наших исследованиях, что в зависимости от концентрации СК может оказывать, как разобщающее, так и ингибирующее действие на дыхание митохондрий растений, включая митохондрии семян *L. luteus* (Norman *et al.*, 2004; Шугаев и др., 2014). Кроме того, было обнаружено, что увеличение концентрации СК существенно усиливало образование АФК митохондриями семян *L. luteus* (Буцанец и др., 2021).

В настоящее время мультигенное семейство альтернативной оксидазы в люпине не секвенировано, поэтому целью данной работы была идентификация генов АОХ *L. luteus* с последующим изучением влияния СК на их экспрессию и активность альтернативного пути дыхания в митохондриях семян.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объект исследования.** В качестве растительного объекта в работе были использованы семена этиолированных проростков люпина желтого (*Lupinus luteus* L., сорт Дружный 165) и изолированные из них митохондрии. Проращивание семян проводили в термостате при 25°C без света в течение 84 ч, затем семена отделили от зародыша и инкубировали во влажной камере на дистиллированной воде в течение 12 ч. Для изучения влияния СК на АП и экспрессию генов АОХ семя-

доли переносили на фильтровальную бумагу, пропитанную водой (контроль) или раствором СК (0.1, 0.5, 1 мМ) в тех же условиях в течение 12 ч.

*Митохондрии* из семян *L. luteus* выделяли с использованием метода дифференциального центрифугирования как описано ранее (Шугаев и др., 2014). Циклы центрифугирования проводили на высокоскоростной центрифуге с охлаждением HITACHI CR22G-III (“Hitachi”, Япония) при 4°C. Пробирку с полученной суспензией интактных митохондрий хранили во льду.

**Скорость дыхания митохондрий измеряли амперометрически** на приборе Oxytherm Electrode Control Unit (“Hansatech Instruments”, Англия). Активности различных путей митохондриального окисления определяли с использованием специфических ингибиторов терминальных оксидаз дыхательной цепи: 2 мМ цианида калия (ингибитор цитохромоксидазы) и 3 мМ салицилгидроксамовую кислоту (СГК; ингибитор АОХ). Активность АП дыхания определяли по скорости поглощения O<sub>2</sub> митохондриями при окислении малата в присутствии глутамата, которая ингибируется под действием СГК в присутствии цианида (Шугаев, 1999).

**Методы молекулярной биологии.** Геномную ДНК экстрагировали методом фенольно-хлороформной экстракции (Sambrook *et al.* 1989). Плазмидную ДНК получали по методу Birnboim, Doly (1979), тотальную РНК выделяли по методу Chomczynski, Sacchi (1987). Синтез кДНК на матрице РНК выполняли по протоколу RevertAid M-Mul.V Reverse Transcription (“Fermentas”) с олиго(dT)18-праймерами. Праймеры для амплификации фрагментов целевых генов, а также биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей генов осуществляли в программах Unipro UGENE и Vector NTI.

Уровень экспрессии генов АОХ оценивали в полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) на амплификаторе Light Cycler (“Roche”, Швейцария) с использованием кДНК в качестве матрицы и специфических праймеров генов АОХ (табл 1). ПЦР-продукты разделяли в 1–2%-ном агарозном геле. Результаты гелеэлектрофореза оцифровывали, используя сканер-фосфоимиджер Typhoon (“GE Healthcare”).

Для исследования нуклеотидной последовательности фрагментов целевых генов ампликоны ПЦР лигировали с плазмидным вектором pTZ57R/T с использованием набора InstAclon<sup>TM</sup> PCR Cloning Kit (“Fermentas”) по протоколу и отдавали на секвенирование в компанию “Синтол”.

**Статистика.** Все эксперименты проводили в 3-х биологических и 3-х аналитических повторностях. На рисунках приведены данные характерных опытов, данные на диаграммах выражают

**Таблица 1.** Список использованных праймеров в работе по идентификации и изучению экспрессии генов белка альтернативной оксидазы *L. luteus*

| Ген                |              | Прямой праймер                 | Обратный праймер                |
|--------------------|--------------|--------------------------------|---------------------------------|
| <i>A. thaliana</i> | <i>AOX1a</i> | F: 5'-ggaccacgtttgttctcgacg-3' | R: 5'-cctccaaccattccWggWacYg-3' |
|                    | <i>AOX1b</i> | F: 5'-ctgctgtgactcacagccatc-3' | R: 5'-cctccaaccattccWggWacYg-3' |
|                    | <i>AOX1c</i> | F: 5'-gcatcaaagcaagcgacatcc-3' | R: 5'-cctccaaccattccWggWacYg-3' |
|                    | <i>AOX1d</i> | F: 5'-cctacagatcgattaccgc-3'   | R: 5'-cctccaaccattccWggWacYg-3' |
|                    | <i>AOX2</i>  | F: 5'-cgtgagtctgttctccac-3'    | R: 5'-cctccaaccattcctggactg-3'  |
| <i>L. luteus</i>   | <i>AOX1a</i> | F: 5'-gaatggaagtggaactgttc-3'  | R: 5'-cggtaggccaacgaagagatt-3'  |
|                    | <i>AOX1d</i> | F: 5'-catcataaacctccaattca-3'  | R: 5'-gccaccgtctctagaacat-3'    |
|                    | <i>AOX2</i>  | F: 5'-gatgaaattactcggaaaga-3'  | R: 5'-gaggagcttgacaatccggta-3'  |
|                    | <i>UBQ</i>   | F: 5'-agcaaaaatccaggacaagg-3'  | R: 5'-tccacggagacgtaaaca-3'     |

средние арифметические значения и стандартное отклонение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

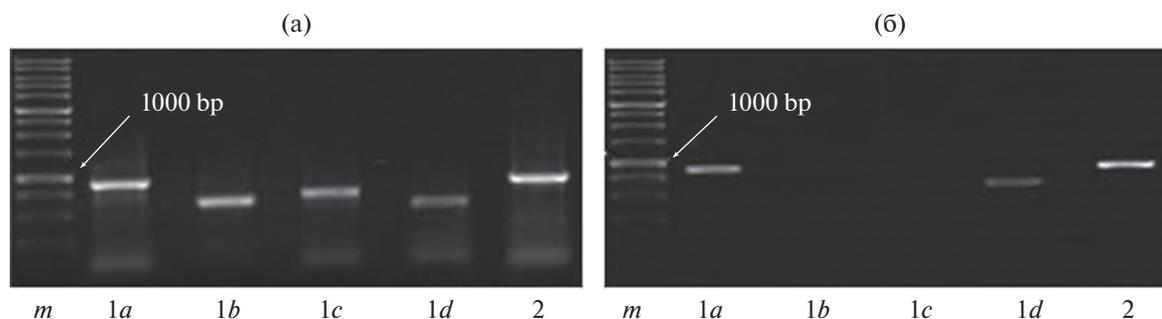
Для идентификации генов *AOX* у *L. luteus* за основу были выбраны известные последовательности генов *AOX A. thaliana*. Были подобраны праймеры к участкам всех 5 генов ядерного кодирования *AOX A. thaliana* (*AOX1a*, *1b*, *1c*, *1d* и *2*) длиной ~1000 п. н. (табл. 1) с зоной интрона и таким образом, чтобы длина получаемых фрагментов с кДНК составляла ~120 п. н.

С использованием ген-специфичных праймеров для пяти генов белка *AOX A. thaliana* (табл. 1) на геномной ДНК, выделенной из семядолей этиолированных проростков *L. luteus*, в качестве матрицы, нами были получены фрагменты трех схожих генов белка *AOX* (рис. 1б). Полученные ПЦР-фрагменты были очищены и клонированы в вектор pTZ57R/T. Целевые конструкции использовали для секвенирования полученных фрагментов.

Определение нуклеотидной последовательности (секвенирование) изучаемых фрагментов и дальнейший биоинформационный анализ пока-

зали, что идентичность нуклеотидных последовательностей фрагментов трех выявленных генов *AOX L. luteus* с генами *AOX A. thaliana* составляла 100% (рис. 2). Таким образом, обнаружено, что *AOX L. luteus* кодируется тремя генами из двух подсемейств – *AOX1a*, *AOX1d* и *AOX2*.

Далее, методом полуколичественного ПЦР после обратной транскрипции изучали влияние различных концентраций СК на накопление матричных РНК (мРНК) генов *AOX L. luteus* (рис. 3а). Для этого интактные семядоли проростков выдерживали во влажной камере на воде (контроль) или на растворах СК различной концентрации в течение 12 ч. Показано, что в контрольных семядолях *L. luteus* обнаруживалась только мРНК гена *AOX2* (рис. 3а). Выдерживание интактных семядолей на растворе 0.5 мМ СК приводило к заметному увеличению содержания мРНК гена *AOX2*, что не наблюдалось при более высокой концентрации фитогормона (рис. 3а, 3б). Напротив, 1 мМ СК индуцировала накопление *de novo* мРНК гена *AOX1a*. Стоит отметить, что транскриптов гена *AOX1d* не обнаружено ни в одном варианте (рис. 3а). Интересно, что при действии очень высокой концентрации фитогормона (5 мМ СК) не было



**Рис. 1.** Результаты электрофореза после амплификации на геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* (а) или *Lupinus luteus* (б) в качестве матрицы с использованием генспецифичных праймеров для генов альтернативной оксидазы *Arabidopsis thaliana*. Обозначения: *m* – маркер длин фрагментов ДНК (1 т.п.н.).

*AOX1a:*

ggaccacgtttgttctcgacgggtccgtacgggttcgtctcacgaggctttatcagcaagccatatttgaagcctgggtttacat  
ctgcttggatatggactagagctccgacgattggaggatgagattcgtctagcagcatcactctgggagagaaaactccgat  
gaaggaggaggacgcgaatcagaagaaaacagagaacgaatccaccgggtggagacgccgccggaggtaataacaag  
ggagataaagggaatcgcgagctattgggggttgaacctaaataagattactaaagaagatggttctgaatggaaagtggaaact  
gtttcagggtacgttatagctagattcgtatacagtgtgttctctcgttgatctgtgtaaattgttgaaattctttggattttgcag  
ccatgggaaacgtataaagctgatataacgatagatctgaaagaagcatcatgtccaacgacgtttcttgatagaatagcttat  
tggactgttaaatctctcgttggcctaccgattgttctccaggtactgttcttcttcttctcccatggaaaattctttacatttt  
ttgccaattttatgatatggaaatgatccaaatctgatctgctattgattacgtgtaaccttaaatattttattcattctttatagc  
aactagtcaatattttgttatttttggaaatatagtgtttattatataatcacttcgttagtgccttggattcttggtaattgttgg  
ttaattatcattatgtaatgaattattggtaattgttggctgattgtgatattgtgaattaaaacagaggagatatggatgctgag  
ctatgatgcttgaactgtagcagcagtagctacctggaatggttgga

*AOX1d:*

cctacagatcgatttaccgcactcttcgaccggtaactatcttccgtacaatcctccggttaggaattggaggattcaggg  
gacatctcattagccacttgcccaatgttcggctattgagctctgacacgtcatctccggtaaagggggaataaccagccagaa  
aatcctatccgaacggccgatggtaaagtatatccacttattgggggtatacctcctactaagatcactaaaccggacgggtca  
gcttggaaagtgaattgtttcagccatgggattcatacaaacggatgtgtccattgatgtaactaaacatcataaacctcc  
aattcactgacaaattcgcataattggaccgtcaaacctctgaaaataccgggtcaactatttttcaggttaattatcagaaattt  
taaactcttctcattgttcttttttaaacatgattttgtttttcaaaaattgaataattgattttgagtatagaggaaacacatgt  
gccatgcatgttgcctagagacgggtggctgcgggtgccgggaatggt

*AOX2:*

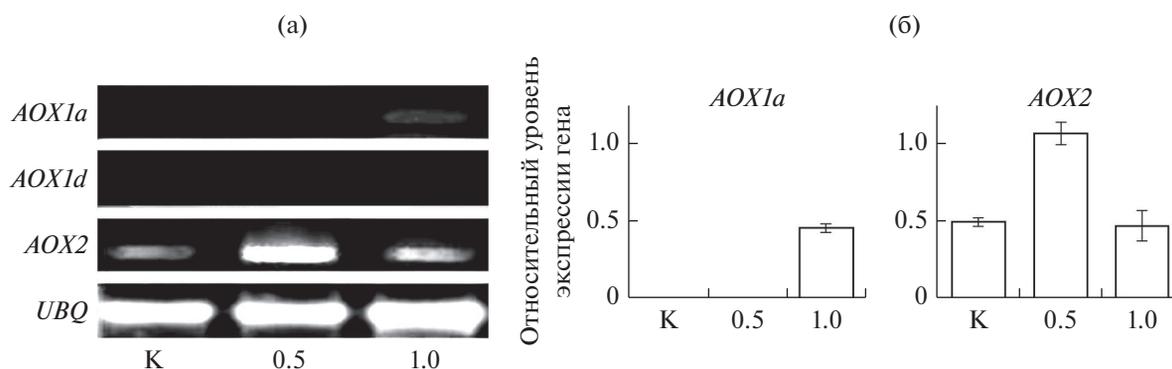
ttcgtgagttctgttctccacctctgttatgaaaagtcctgatgagataacggcaccgatgcgaattcatgactgggtcggc  
ggttttggcgatttcaagatcggctctaaagcatgtgcaagggtgtgcatactgtagatgatcctatacaaccttataacaattgt  
acatgataaattaggattgtatatttctaaaatttgaataggaatttttaacttgaaggatgggtatgagttctgcatcggcgat  
ggagaagaagatgaaaatttgacggtaaaagagggtcaaacggcgggggggtcagtagcgggtccaagttattgggga  
atagagacagcaaaagatgaaaattactcggaaagatggatcggattggccttggaaactgtttatggtaaacctatacacatc  
ccaagttcgtagacaaattaagcactctttatgtatgtagatataatgacttaagtataatttgaacagccatgggagacttate  
aagcaaatctgtcagatagattgaaagaacaccacgttccgaagaatacggcacaagtcgcttaccggattgtcaagct  
cctccgatttcccaccgatataattttcagggatgactgtaatttcaaaattttaaataaaacggttgattcgttataatgttcatg  
gtttatttagctgattcggtttggtttggtttgaattttgatgcacatattatcctaccatgattcacaataacacatgattggatt  
cactgttccactcactgctaatgttttactttttgttccctaatgttaaatatattgttggtcagcagagacgatatggatgacag  
agcagatgatgctagagacagtagctgcagtagctaccaggaatggttggaaggaat

**Рис. 2.** Нуклеотидные последовательности лидирующих цепей изучаемых фрагментов генов альтернативной оксидазы *Lupinus luteus*.

идентифицировано мРНК ни одного из трех исследуемых генов АОХ люпина (данные не представлены). Возможно, это связано с более ранним ответом АОХ на воздействие высокой концентрации СК. Таким образом, показано, что в семядолях этиолированных проростков *L. luteus* под влиянием СК происходят количественные и качественные

изменения пула транскриптов генов, кодирующих АОХ.

Как уже было отмечено выше, экспрессия гена *AOX1a* регулируется 10 высокочувствительными к перекиси *цис*-элементами, но не чувствительными к СК (Но *et al.*, 2008). Возможно, что влияние



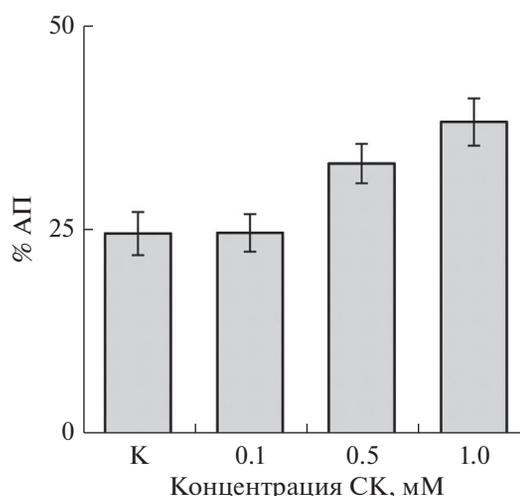
**Рис. 3.** Влияние различной концентрации СК в течение 12 ч на изменение количества транскриптов генов альтернативной оксидазы в интактных семядолях этиолированных проростков *Lupinus luteus*. Результаты электрофореза после ПЦР (а) и нормализованные относительно уровня референсного гена убиквитина (*UBQ*) содержания мРНК (б) в относительных единицах.

СК осуществляется через процессы, регулирующие редокс-состояние и уровень АФК как митохондрий, так и клетки в целом. На изолированных митохондриях растений было показано, что СК в зависимости от концентрации разобщает или ингибирует митохондриальное дыхание (Norman *et al.*, 2004; Шугаев и др., 2014). Исходя из этого, зависимость индукции гена *AOX1a* от концентрации фитогормона можно объяснить тем, что 1 мМ СК, ингибируя работу ЭТЦ митохондрий и, возможно, активность антиоксидантных ферментов, усиливает генерацию и накопление АФК в митохондриях, а в более низких концентрациях, разобщая дыхание, препятствует их образованию (Moller, 2001; Norman *et al.*, 2004). Действительно, данные литературы, полученные на ткани листьев *A. thaliana* и на выделенных из них митохондриях, подтверждают зависимость уровня АФК от концентрации СК (Nie *et al.*, 2015; Belt *et al.*, 2017).

Известно, что изменение экспрессии гена под влиянием различных эффекторов не всегда сопровождается параллельным изменением скорости биосинтеза кодируемого им белка, а также активности этого белка. Отличительная особенность белка АОХ в том, что он функционирует в виде гомодимера и в результате изменения типа связи между тиоловыми группами консервативных участков двух мономеров молекулы АОХ осуществляется биохимическая регуляция его работы. Образование окисленной формы димера (формирование дисульфидных ковалентных связей) должно приводить к существенному снижению активности АОХ (Umbach *et al.*, 2002). Тем не менее, было обнаружено, что под влиянием СК происходило не только накопление продуктов экспрессии соответствующих генов АОХ (рис. 3а), но и увеличение максимальной активности АП в изолированных митохондриях (рис. 4). Данные свидетельствующие об увеличении активности АП под влиянием 0.5–1 мМ СК, получены также на других расти-

тельных объектах (Gilliland *et al.*, 2003; Clifton *et al.*, 2006; Fung *et al.*, 2006). Однако наши данные не согласуются с результатами, полученными на культуре клеток *Nicotiana tabacum* L., где СК в низкой концентрации (0.1–0.5 мМ) индуцировала экспрессию гена *AOX1a*, а в высокой (3 мМ) — нет (Cvetkovska, Vanlerberghe, 2012). Возможно, что клетки суспензионной культуры более чувствительны к влиянию экзогенной СК, чем клетки ткани семядолей, или это обусловлено более ранним ответом АОХ на воздействие высокой концентрации фитогормона.

Таким образом, в семядолях *Lupinus luteus* нами идентифицировано три ядерных гена АОХ двух подсемейств (*AOX1a*, *AOX1d* и *AOX2*), кодирующих различные изоформы белка. Обнаруженная СК-индукция гена *AOX2* ранее была показана только на прорастающих семенах *V. unguiculata*, где под-



**Рис. 4.** Влияние СК на активность альтернативного пути дыхания (АП) при окислении малата митохондриями семядолей *Lupinus luteus*.

семейство *АОХ2* представлено двумя генами (*АОХ2a*, *АОХ2b*), один из которых (*АОХ2b*) индуцировался гормоном. Постулируется, что стресс-индуцибельность конститутивных генов приобретает присоединением к промотору регуляторных *цис*-элементов, чувствительных к окислительному стрессу. Ранее было показано, в том числе, и в наших экспериментах, что увеличение концентрации СК существенно усиливало образование АФК митохондриями растений, включая митохондрии семядолей *L. luteus*, т.е. способствовало возникновению окислительного стресса. Однако в данной работе при инкубации семядолей в присутствии 1 мМ СК увеличения экспрессии гена *АОХ2* не было обнаружено. На основании этого, можно предположить, что активация экспрессии гена *АОХ2* не связана с повышением уровня АФК и окислительным стрессом, а реализуется, по-видимому, с участием другого регуляторного механизма. Исходя из обнаруженных различий в механизмах регуляции СК экспрессии двух генов *АОХ*, не исключено, что кодируемые ими изоформы белка играют в метаболизме митохондрий семядолей *L. luteus* различную функциональную роль.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках государственного задания (номер темы 121040800153-1).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Буцанец П.А., Шугаева Н.А., Шугаев А.Г. Влияние мелатонина и салициловой кислоты на генерацию АФК митохондриями семядолей люпина // Физиология растений. 2021. Т. 68. С. 421–429.
- Грabelных О.И., Побежимова Т.П., Павловская Н.С., Королева Н.А., Боровик О.А., Любушкина И.В., Войников В.К. Антиоксидантная функция альтернативной оксидазы в митохондриях озимой пшеницы при холодовом закаливании // Биол. мембраны 2011. Т. 28 № 4 С. 274–283.
- Шугаев А.Г. Альтернативная CN-резистентная оксидаза митохондрий растений: структурная организация, механизмы регуляции активности, возможная физиологическая роль // Физиология растений. 1999. Т. 46. С. 307–320.
- Шугаев А.Г., Буцанец П.А., Андреев И.М., Шугаева Н.А. Влияние салициловой кислоты на метаболическую активность митохондрий растений // Физиология растений. 2014. Т. 61. С. 43–52.
- Van Aken O. Mitochondrial redox system as central hubs in plant metabolism and signaling // Plant Physiol. 2021. V. 186. P. 36–52.
- Belt K., Huang S., Thatcher L.F., Casarotto H., Singh K.B., Van Aken O., Millar A.H. Salicylic acid-dependent plant stress signaling via mitochondrial succinate dehydrogenase // Plant Physiol. 2017. V. 173. P. 2029–2040.
- Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids Res. 1979. V. 7. P. 1513–1523.
- Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // An. Biochem. 1987. V. 162. P. 156–159.
- Clifton R., Millar A.H., Whelan J. Alternative oxidase: a comparative analysis of different expression in the gene family provides new insights into function on nonphosphorylating bypasses // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1757. P. 730–741.
- Considine M.J., Holtzapffel R.C., Day D.A., Whelan J., Millar A.H. Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots // Plant Physiol. 2001. V. 129. P. 949–953.
- Costa J.H., Mota E.F., Cambursano M.V., Lauxmann M.A., de Oliveira L.M.O., Lima M.G.S., Orellano E.G., de Melo D.F. Stress-induced co-expression of two alternative oxidase (VuAox1 and 2b) genes in *Vigna unguiculata* // J. Plant Physiol. 2010. V. 167. P. 561–570.
- Cvetkovska M., Vanlerberghe G.C. Coordination of a mitochondrial superoxide burst during the hypersensitive response to bacterial pathogen in *Nicotiana tabacum* // Plant, Cell Environ. 2012. V. 35. P. 1121–1136.
- Dojcinovic D., Krosting J., Harris A.J., Wagner D.J., Rhoads D.M. Identification of a region of the Arabidopsis AtAOX1a promoter necessary for mitochondrial retrograde regulation of expression // Plant Mol. Biol. 2005. V. 58. P. 159–175.
- Fung R.W., Wang C.Y., Smith D.L., Gross K.C., Tao Y., Tian M. Characterization of alternative oxidase (AOX) gene expression in response to methyl salicylate and methyl jasmonate pre-treatment and low temperature in tomatoes // Plant Physiol. 2006. V. 163 P. 1049–1060.
- Garmash E.V., Velegzhaninov I.O., Ermolina K.V., Rubak A.V., Malyshev R.U. Altered levels of *AOX1a* expression results in changes in the metabolic pathways in *Arabidopsis thaliana* plants acclimated to low dose rates of ultraviolet B radiation // Plant Sci. 2020. V. 291: 110332.
- Gilliland A., Singh D.P., Hayward J.M., Moore C.A., Murphy A.M., York C.J., Slator J., Carr J.P. Genetic modification of alternative respiration has differential effects on antimycin A-induced versus salicylic acid-induced resistance to Tobacco mosaic virus // Plant Physiol. 2003. V. 132(3) P. 1518–1528.
- Ho L.H.M., Giraud E., Uggalla V., Lister R., Clifton R., Glen A., Thirkettle-Watts D., Van Aken O., Whelan J. Identification of regulatory pathways controlling gene expression of stress-responsive mitochondrial proteins in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2008. V. 147. P. 1858–1873.
- Macherel D., Benamar A., Avelange-Macherel M.H., Tölleter D. Function and stress tolerance of seed mitochondria // Physiol. Plant. 2007. V. 129. P. 233–241.
- Maruri-López I., Aviles-Baltazar N.Y., Buchala A., Serrano M. Intra and extracellular journey of the phytohormone salicylic acid // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. P. 423.
- Maxwell D.P., Nickels R., McIntosh L. Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with patho-

- gen attack and senescence // *Plant Journal*. 2002. V. 29. P. 269–279.
- Millar A.H., Whelan J., Soole K.L., Day D.A. Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants // *Ann. Rev. Plant Biol.* 2011. V. 62. P. 79–104.
- Møller I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species // *Annu Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 2001. V. 52 P. 561–591.
- Nie S., Yue H., Zhou J., Xing D. Mitochondria-derived reactive oxygen species play a vital role in the salicylic acid signaling pathway in *Arabidopsis thaliana* // *PLoS One*. 2015. V. 10. e0119853.
- Norman C., Howell K.A., Millar A.H., Whelan J.M., Day D.A. Salicylic acid is uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport // *Plant Physiol.* 2004. V. 134. P. 492–501.
- Raskin I., Ehmann A., Melander W.R., Meeuse B.J.D. Salicylic acid: A natural inducer of heat production in *Arum lilies* // *Science*. 1987. V. 237. P. 1601–1602.
- Rivas-San Vicente M., Plasencia J. Salicylic Acid beyond Defence: Its Role in Plant Growth and Development // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 3321–3338.
- Saisho D., Nakazono M., Lee K.H., Tsutsumi N., Akita S., Hirai A. The gene for alternative oxidase-2 (AOX-2) from *Arabidopsis thaliana* consists of five exons unlike other AOX genes and is transcribed at an early stage during germination // *Genes Genet. Systems*. 2001. V. 76 P. 89–97.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. // Cold Sp. Harbor Lab. Press. 1989.
- Selinski J., Scheibe R., Day D. A., Whelan J. Alternative oxidase is positive for plant performance // *Trends Plant Sci*. 2018. V. 23. P. 588–597.
- Umbach A.L., Gonzalez-Meler M.A., Sweet C.R., Siedow J.N. Activation of the plant mitochondrial alternative oxidase: insights from site-directed mutagenesis // *Biochim. Biophys. Acta*. 2002. V. 1554 P. 118–128.
- Vanlerberghe G.C. Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants // *Int. J. Mol. Sci*. 2013. V. 14. P. 6805–6847.
- Vanlerberghe G.C., Dahal K., Alber N.A., Chadee A. Photosynthesis, respiration and growth: A carbon and energy balancing act for alternative oxidase // *Mitochondrion*. 2020. V. 52. P. 197–211.
- Vlot A.C., Dempsey D.A., Klessig D.F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease // *Annu. Rev. Phytopatol.* 2009. V. 47 P. 177–206.

## Identification of Alternative Mitochondrial Oxidase Genes in *Lupinus luteus* and Influence on their Expression of Salicylic Acid

P. A. Butsanets<sup>1, #</sup>, N. A. Shugaeva<sup>1</sup>, and A. G. Shugaev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Timiryazev institute of plant physiology RAS, Botanicheskaya ul., 35, Moscow, 127276 Russia

<sup>#</sup>e-mail: p.corbeau@list.ru

The effect of the stress phytohormone, salicylic acid (SA), on changes in the activity of the alternative respiration pathway and the expression of alternative mitochondrial oxidase genes in the cotyledons of etiolated lupine seedlings (*Lupinus luteus* L.) was studied. It was found that *L. luteus* has at least 3 nuclear genes of two subfamilies (*AOX1a*, *AOX1d*, and *AOX2*) encoding different isoforms of the alternative oxidase protein. Activation of SA of the alternative oxidation pathway in mitochondria and accumulation of transcripts of two alternative oxidase genes (*AOX1a* and *AOX2*) were revealed. Gene expression depended on the concentration of the phytohormone. At 0.5 mM concentration of the phytohormone, the content of mRNA of the *AOX2* gene increased, and at 1 mM SA, *de novo* accumulation of transcripts of the *AOX1a* gene occurred.

**Keywords:** *Lupinus luteus*, cotyledons, mitochondria, salicylic acid, alternative oxidase, gene expression

УДК 591.15+599.32

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ СТЕПНОЙ ПЕСТРУШКИ (*Lagurus lagurus* Pall) НА СЕВЕРО-ВОСТОКЕ АРЕАЛА

© 2022 г. Т. А. Дупал\*, @, С. А. Абрамов\*, Ю. Н. Литвинов\*

\*Институт систематики и экологии животных СО РАН, ул. Фрунзе, 11, Новосибирск, 630091 Россия

@E-mail: gf@eco.nsc.ru

Поступила в редакцию 21.06.2021 г.

После доработки 05.10.2021 г.

Принята к публикации 20.10.2021 г.

С помощью многомерного статистического анализа исследована изменчивость 12 краниальных и 7 дентальных признаков взрослых особей степной пеструшки из 6 популяций северо-восточной части ареала. Уровень выявленных межпопуляционных различий в размерах и форме черепа значительно превышает уровень половых различий. Изолированные популяции степной пеструшки из Чулымо-Енисейской котловины характеризуются более крупными размерами черепа по сравнению с животными из Западной Сибири и Казахстана, а также относительно меньшей длиной лицевого отдела и носовых костей, относительно более короткими зубными рядами, меньшей высотой затылочной кости. Самой мелкой формой является карасукская популяция. Сравнение географических дистанций между выборками с подвидовой систематикой позволило отнести степных пеструшек из Чулымо-Енисейской котловины к подвиду *abacanicus*, а всех остальных – к подвиду *lagurus*.

**Ключевые слова:** *Lagurus lagurus*, географическая изменчивость, подвид, Сибирь, Казахстан, краниометрия

**DOI:** 10.31857/S1026347022060051

Известно, что изоляция является важной предпосылкой для видообразования. Поток генов между популяциями может быть подавлен какой – либо физической или географической преградой. Если две популяции географически изолированы, то они дивергируют генетически и, в конечном итоге, могут развиваться изолирующие механизмы, приводящие к морфологическим различиям (Майр, 1971, 1974). Понимание того, что межпопуляционная морфологическая изменчивость реализуется через совокупность как внутренних (генетических), так и внешних (экологических) средовых факторов, позволяет вести поиск общих закономерностей географической изменчивости, учитывая, что изоляция является одним из основных условий сохранения отчетливых межпопуляционных различий. Как считал С.С.Шварц (1980, стр.127), “любая в репродуктивном отношении изолированная популяция (полная изоляция не обязательна) морфологически специфична”.

Развитие молекулярно-генетических исследований привело к новому подходу анализа различий между популяциями и таксонами. Однако таксономическая и филогенетическая трактовка генетических результатов может не соответствовать морфологическим данным (Ковалева и др., 2012), которые приводятся в систематических сводках.

Тем более, что межпопуляционные особенности отдельных видов млекопитающих морфологически изучены очень слабо и встает вопрос о надежности выделения внутривидовых форм. Использование морфометрических признаков с применением многомерного статистического анализа в межпопуляционных сравнениях становится в настоящее время хорошим инструментом для понимания разных форм изменчивости.

Широко распространенные грызуны, обитающие в различных ландшафтах и с разной степенью изоляции популяций, могут служить модельным объектом для изучения различных форм внутривидовой изменчивости. Одним из таких видов является степная пеструшка *Lagurus lagurus* Pall. (1773), заселяющая равнинные, горные степи и полупустыни. Ареал вида включает низовье Днепра, Южный Урал, Северный Казахстан, Зайсан, восточное Прибалхашье, Алтайские и Кулундинские степи, распространен в Рязанской, Саратовской областях и в Чувашии. Южная часть ареала – это горы и предгорья Северного Тянь-Шаня и Джунгария, север Китая. Изолированные участки ареала встречаются в Убсу-Нурской и в Минусинской котловинах (Огнев 1950; Громов. Ербаева, 1995; Shenbrot, Krasnov, 2005).

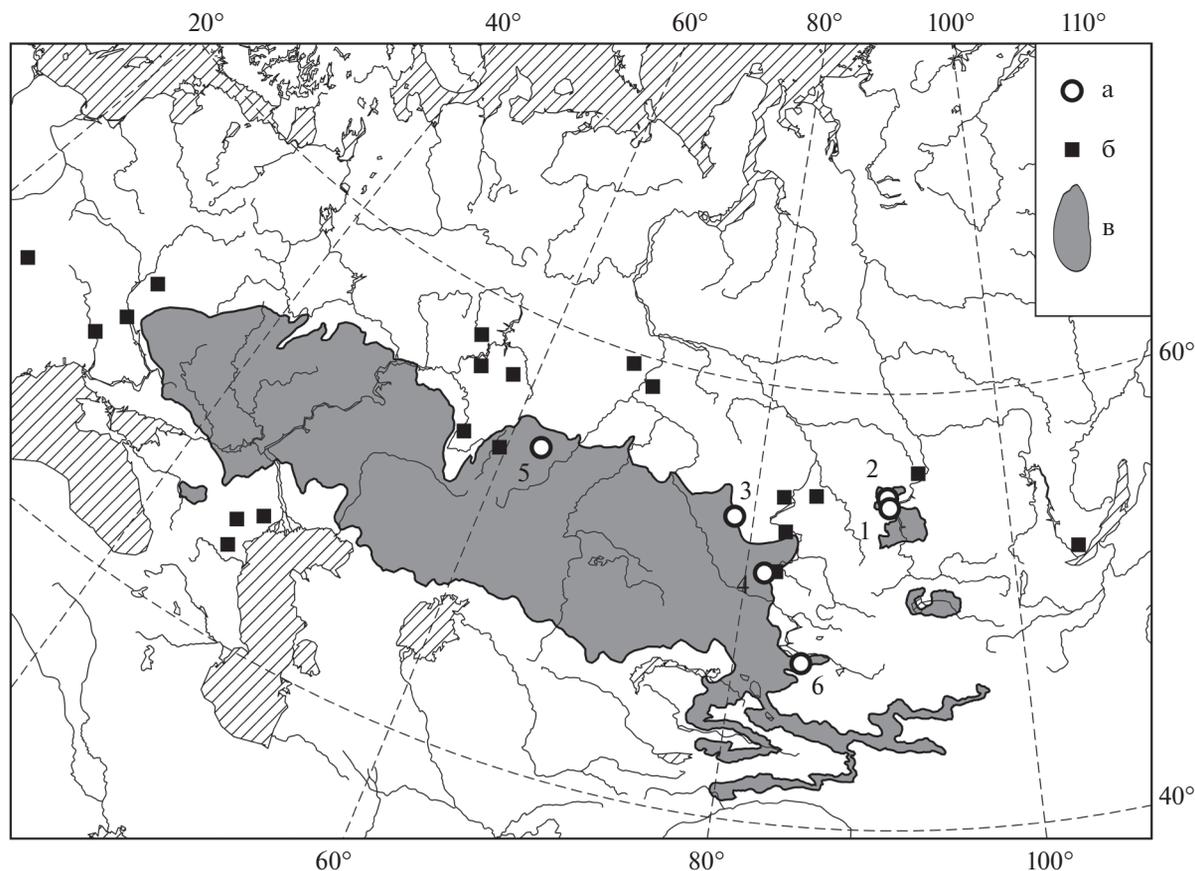


Рис. 1. Карта-схема мест отлова (а), находок ископаемых остатков (б), современный ареал (по Shenbrot, Krasnov B.R., 2005, в) степной пеструшки. Номера выборок в табл. 2.

Из палеонтологической летописи известно, что на территории Восточной Европы и Северной Азии степная пеструшка встречается со среднего плейстоцена. На территории Западной Сибири *Lagurus cf. lagurus* обнаружена в нижнеиртышской фауне совместно с тундровыми, степными и лесными видами (Косинцев и др., 2004). Ископаемая фауна Чембакчинской свиты, в которой присутствует степная пеструшка, соответствует тобольскому горизонту, TL-даты включают интервал  $390 \pm 80 - 290 \pm 58$  тыс. лет назад (Волкова и др., 2002), что соответствует 11–12 изотопным стадиям среднего плейстоцена (Shakleton, Opdyke, 1977). Во второй половине позднего плейстоцена животные заселяли перигляциальные ландшафты со своеобразным (в широком смысле) типом климатического режима и растительного покрова. Характерной особенностью этого периода были суровый климат, малое количество осадков (особенно зимних), сильно разреженная лесистость, холодолюбивая и ксерофитная флора, широкое развитие мерзлотных процессов и относительно твердое состояние почвы летом. Потепление в голоцене сопровождалось увеличением влажности и расши-

рением лесной растительности. Произошло сокращение ареала *L. lagurus* (рис. 1), которое привело, по-видимому, к определенным морфологическим изменениям (Поздняков, Сенотрусова, 2006). Западная часть ареала сместилась в восточном направлении, а восточная в западном. В конце голоцена степная пеструшка исчезла в Западной Европе, в Западной Украине, с территории Русской равнины, Среднего Урала, Среднего Енисея, Кузнецкой котловины, Северо-Западного Алтая и Предбайкалья. Сократилась юго-восточная часть ареала. Непрерывная часть современного ареала проходит по степной зоне и полупустыне Евразии. Кроме того, остались два небольших изолированных участка в Хакасии и Монголии.

Целью работы является изучение межпопуляционной изменчивости краниальных и одонтологических признаков степной пеструшки при отсутствии и наличии изоляционных барьеров, и сопоставление найденных морфологических различий с существующими представлениями о внутривидовой таксономии этого вида.

**Таблица 1.** Половые различия экстерьерных признаков половозрелых сеголетков степной пеструшки карасукской популяции

| Признак        | Самцы, <i>ad1</i> , <i>n</i> = 39 |           | <i>t</i> | Самки, <i>ad1</i> , <i>n</i> = 30 |           |
|----------------|-----------------------------------|-----------|----------|-----------------------------------|-----------|
|                | <i>M</i> ± <i>m</i>               | <i>CV</i> |          | <i>M</i> ± <i>m</i>               | <i>CV</i> |
| Длина тела, мм | 90.34 ± 0.91                      | 6.3       | 0.61     | 91.40 ± 1.48                      | 7.6       |
| » хвоста       | 11.68 ± 0.27                      | 14.6      | 2.67**   | 12,08 ± 0.28                      | 10.8      |
| » ступни       | 13.65 ± 0.17                      | 7.9       | 3.92***  | 12.65 ± 0.19                      | 7.2       |
| Масса тела, г. | 18.54 ± 0.54                      | 18.1      | 0.35     | 18.89 ± 0.82                      | 20.4      |

Примечание. \*\* ( $p < 0.01$ ) \*\*\* ( $p < 0.001$ ), уровень значимости.

**Таблица 2.** Географические координаты мест отлова и объем выборок взрослых самцов и самок степной пеструшки

| Локалитет   | Географич. координаты        | Кол-во самцов | Кол-во самок | Всего | Источник        |
|---|------------------------------|---------------|--------------|-------|-----------------|
| Хакасия, Ширинский р-он, с. Соленоозерное (1)               | 54.725° с.ш.<br>89.918° в.д. | 21            | 19           | 40    | ИСиЭЖ<br>СО РАН |
| Красноярский край, Ужурский р-он, оз. Учум (2)              | 55.125° с.ш.<br>89.706° в.д. |               |              | 12    | ИСиЭЖ<br>СО РАН |
| Новосибирская обл., Карасукский р-он, с. Троицкое (3)       | 53.729° с.ш.<br>77.865° в.д. | 24            | 24           | 48    | Данные авторов  |
| Алтайский край, Локтевский, Змеиногорский р-оны (4)         | 51.158° с.ш.<br>82.083° в.д. | 2             |              | 14    | ЗИН<br>РАН      |
| Северный Казахстан, Кустанайская обл. (5)                   | 53.487° с.ш.<br>64.207° в.д. | 5             | 4            | 9     | ЗИН<br>РАН      |
| Казахстан, Восточно-Казахстанская обл., Зайсанский р-он (6) | 47.313° с.ш.<br>84.796° в.д. | 7             | 8            | 15    | ЗИН<br>РАН      |

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал собирали в подзоне лугостепей степной зоны юга Западной Сибири, в 15 км южнее г. Карасук (Новосибирская обл.) в 2003–2015 гг. Отлавливали животных ловчими канавками с конусами, а иногда давилками и живоловками. Собранный материал составил 156 зверьков. Наряду с полевым материалом исследованы музейные коллекции черепов из Зоологических музеев Института систематики и экологии животных СО РАН (Новосибирск) и Зоологического института РАН (Санкт-Петербург).

Для выявления половых и возрастных отличий по экстерьерным признакам у животных из Карасука анализировали длину тела, хвоста и ступни, массу тела и состояние половой системы. Самцы и самки карасукской популяции были разбиты на три возрастные группы: молодые, взрослые и перезимовавшие (Тупикова, Каледа, 1957; Шварц, 1980). Сеголетки массой тела 16–19 г. длиной тела 85–94 мм, половозрелые самцы с массой семени больше 100 мг, беременные и с плацентарными пятнами самки отнесены к группе взрослых животных (*ad1*). Размножающиеся зверьки, от-

ловленные в начале лета, массой тела более 20 г, длиной тела больше 100 мм, с хорошо развитыми гребнями черепа, включены в группу перезимовавших (*ad2*). Причем, перезимовавшие самки в отловах очень редки, так как основное время в начале лета проводили в гнездах с новорожденными. Неполовозрелые сеголетки массой тела 10–15 г. отнесены к группе молодых (*subad*). В летний период в отловах преобладают половозрелые и неполовозрелые сеголетки, а доля перезимовавших животных очень мала. При оценке различий между взрослыми самцами и самками карасукской популяции показано, что по длине и массе тела достоверных различий нет. Длина хвоста больше у самок ( $p < 0.01$ ), а ступня достоверно больше у самцов ( $p < 0.001$ ), что видимо, связано с половыми особенностями роста пеструшек (табл. 1). Для анализа морфологической изменчивости черепа и первого нижнекоренного зуба (*m1*) были сформированы выборки из взрослых самцов и самок, которые представлены в табл. 2.

Краниальную изменчивость степной пеструшки изучали по 12 признакам: (1.ДКБ) кондилобазальная длина черепа — от наиболее выдающейся вперед части межчелюстной кости до мышцелков;

(2.ШС) скуловая ширина – наибольшее расстояние между наружными краями скуловых дуг; (3.ДНК) – длина носовых костей; (4. ШМГ) межглазничная ширина – наиболее узкое расстояние между глазницами; (5. ДЛЧ) длина лицевой части – расстояние от выдающейся вперед челюстной кости до мозговой коробки в области сочленения лобной и чешуйчатой костей; (6. ДМЧ) длина мозговой части – расстояние от передней части мозговой коробки до задней стороны затылочных мышцелков; (7. ШЗ) затылочная ширина – наибольшая ширина в области затылка (8. ВЗ) затылочная высота черепа – расстояние от клиновидной кости до верхней точки ламбдоидного гребня затылочной кости; (9. ДВД) длина верхней диастемы – от переднего края альвеол первых коренных зубов до заднего края ближайшей альвеолы резца по правой стороне; (10. ДВЗР) длина верхнего зубного ряда – от переднего края первого правого моляра до заднего края третьего моляра; (11. ДНД) длина нижней диастемы – от переднего края альвеол первого моляра ( $m1$ ) до альвеол резца по правой стороне; (12. ДНЗР) длина нижнего зубного ряда – от переднего края ( $m1$ ) до заднего края третьего моляра по правой стороне. Признаки правого  $m1$ : (13. ДК) – длина коронарного первого нижнекоренного зуба; (14. ДПО) – длина параконидного отдела; (15. ДПП) – длина передней непарной петли; (16. ШНГ) – ширина наибольшая гипоконида; (17. КШПП) – косая ширина ППП; (18. КШГПП) – косая ширина головки ППП; (19. КШШГПП) – косая ширина шейки головки ППП. Схема промеров черепа и  $m1$  приведены на рис. 2.

Измерения черепа сделаны с помощью штангенциркуля с точностью до 0.01 мм, промеры первого нижнего коренного зуба измерены в мм по жевательной поверхности на микроскопе МВС10 с помощью окулярмикрометра.

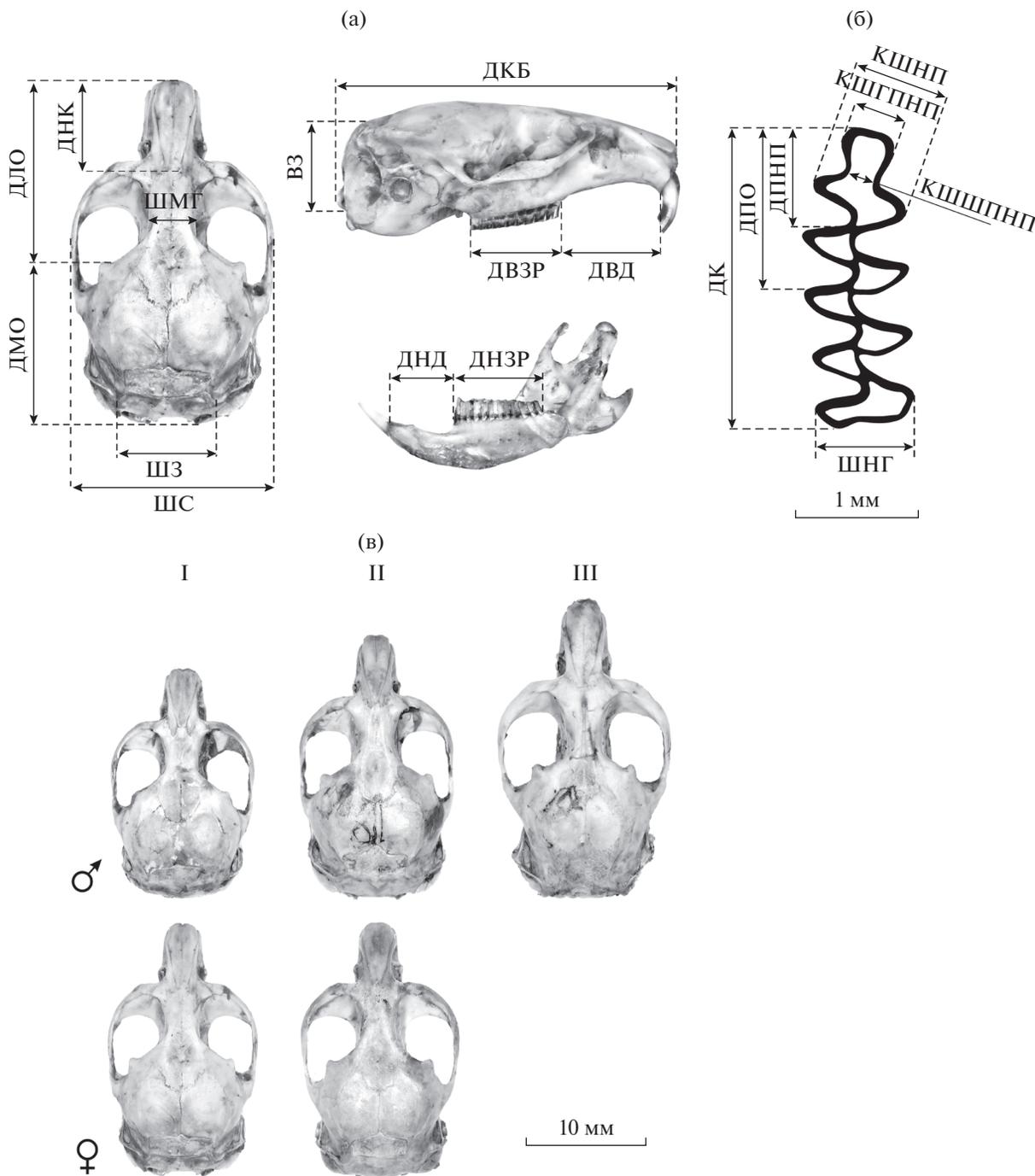
Для статистического анализа изменчивости краниальных и дентальных метрических признаков применяли подход, предложенный Мосиманном (Mosimann, 1970), позволяющий анализировать форму после устранения влияния размеров. В качестве единственной переменной, характеризующей общий размер черепа, было использовано среднее геометрическое всех измерений особи, вычисляемое как корень  $n$ -й степени от произведения  $n$  измерений (Mosimann, 1970; Jungers *et al.*, 1995). В качестве переменных, характеризующих форму черепа, использованы отношения исходных линейных промеров к общему размеру (среднему геометрическому). Полученные таким образом переменные содержат информацию о форме после устранения эффекта изометрического роста (Jungers *et al.*, 1995; Lague, Jungers, 1996). Натуральные логарифмы отношений исходных признаков и геометрического среднего использовали в качестве исходных данных для последующего

анализа. Полученные переменные формы являются избыточными с точки зрения информации, так как одна степень свободы теряется из-за масштабирования (Claude, 2013), и поэтому для описания вариации формы необходимы только 18 переменных. Для уменьшения размерности был выполнен анализ главных компонент всех 19 переменных формы, и только первые 18 главных компонент были использованы для последующего многомерного анализа.

Различия между географическими выборками исследовали с применением одномерного и многомерного дисперсионного анализов (ANOVA\MANOVA). Перед проведением одномерного дисперсионного анализа данные проверяли на соответствие нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка (Shapiro, Wilk, 1965) и на равенство дисперсий, используя тест Левена (Levene, 1960). Перед проведением многомерного дисперсионного анализа данные проверяли на мультиформальность в тесте Дорника–Хансена (Doornik, Hansen, 2008) и эквивалентность ковариационных матриц, используя  $M$ -критерий Бокса (Box, 1949). Также после проведения дисперсионного анализа остатки графически проверяли на нормальность распределения. Во всех случаях распределение остатков соответствовало нормальному. Для оценки величины эффекта вычисляли частичный эта-квадрат (част. $\eta^2$ ), отражающий долю изменчивости зависимых переменных, которая объясняется эффектом.

Известно, что пол животных может быть существенным фактором изменчивости (Schulte–Hostedde, 2008), поэтому предварительно с помощью двухфакторного дисперсионного анализа был проведен анализ значимости половых различий при анализе географической изменчивости. Географическое происхождение (site) и пол (sex) животного рассматривали как факторы. При анализе общего размера использована смешанная модель, при этом фактор пола рассматривали как фиксированный, поскольку количество его уровней *a priori* задано объективным критерием “самец–самка”. Для каждого фактора были определены пропорциональные вклады суммы квадратов (%SS) в общей изменчивости (Leamy, 1983; Bronner *et al.*, 2007). Так как не для всех особей пол известен, анализ выполнен для двух наиболее репрезентативных географических выборок животных с известным полом: ширинской и карасукской.

Для анализа и визуализации межгрупповых различий формы черепа проводили + канонический дискриминантный анализ (Клеска, 1980). На основе дистанций Махаланобиса, вычисленных в дискриминантном анализе, построена дендрограмма методом невзвешенного попарного среднего арифметического (UPGMA).



**Рис. 2.** Схема промеров черепа (а), жевательной поверхности *m1* (б), морфологические особенности черепа самцов и самок разных возрастных групп степной пеструшки (в): I – *subad*, II – *ad1*, III – *ad2*.

Все вычисления и построения графиков выполнены в программах PAST v. 4.03 (Hammer *et al.*, 2001) и Statistica 8 (StatSoft Inc.).

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Анализ значимости факторов изменчивости.** Согласно тесту Шапиро–Вилка ( $0.91 < W < 0.98$ ,

$p > 0.05$ ), распределение всех выборок не отличается от нормального, а тест Левена ( $F_{3.72} = 2.4, p = 0.08$ ) свидетельствует об однородности дисперсии. Двухфакторный дисперсионный анализ общего размера ( $R^2 = 0.77, F_{3.72} = 80.5, p < 0.001$ ) животных с известным полом показал, что различия по географическому фактору (site) высоко значимы ( $F_{1.72} = 857.26, p < 0.0010.05$ , част. $\eta^2 = 0.998$ ), в то

**Таблица 3.** Оценка значимости полового диморфизма при анализе межпопуляционных различий карасукской и ширинской популяций по переменным формы. Значимые факторы отмечены жирным шрифтом

| Источник изменчивости | %SS         | Wilks's $\lambda$ | F            | Df            | p                 | Част. $\eta^2$ |
|-----------------------|-------------|-------------------|--------------|---------------|-------------------|----------------|
| Site                  | <b>28.2</b> | <b>0.092</b>      | <b>30.26</b> | <b>18, 55</b> | <b>&lt;0.0001</b> | <b>0.908</b>   |
| Sex                   | <b>3.8</b>  | <b>0.485</b>      | <b>3.25</b>  | <b>18, 55</b> | <b>0.004</b>      | <b>0.515</b>   |
| site*sex              | 1.1         | 0.691             | 1.37         | 18, 55        | 0.186             | 0.309          |

**Таблица 4.** Значимость различий по общему размеру при попарном сравнении географических выборок в тесте Тьюки. Под диагональю приведены значения Q-критерия, над диагональю – уровень значимости p. Жирным шрифтом отмечены высоко значимые различия ( $p < 0.05$ )

| Выборка          | (1)    | (2)    | (3)          | (4)          | (5)          | (6)          |
|------------------|--------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Ширинская (1)    |        | 0.986  | <b>0.000</b> | <b>0.000</b> | <b>0.004</b> | 0.314        |
| Учумская (2)     | 0.925  |        | <b>0.000</b> | <b>0.000</b> | <b>0.007</b> | 0.229        |
| Карасукская (3)  | 16.630 | 11.970 |              | <b>0.018</b> | <b>0.002</b> | <b>0.004</b> |
| Алтайская (4)    | 6.959  | 6.267  | 4.606        |              | <b>0.975</b> | 0.794        |
| Кустанайская (5) | 5.301  | 5.020  | 5.624        | 1.058        |              | 0.986        |
| Зайсанская (6)   | 2.915  | 3.162  | 5.275        | 1.813        | 0.937        |              |

время, как фактор пола (sex) ( $F_{1,72} = 8.39, p > 0.1$ , част. $\eta^2 = 0.893, p > 0.05$ ) и взаимодействие факторов (site  $\times$  sex) ( $F_{1,72} = 0.28, p > 0.5$ , част. $\eta^2 = 0.004, p > 0.05$ ) не значимы.

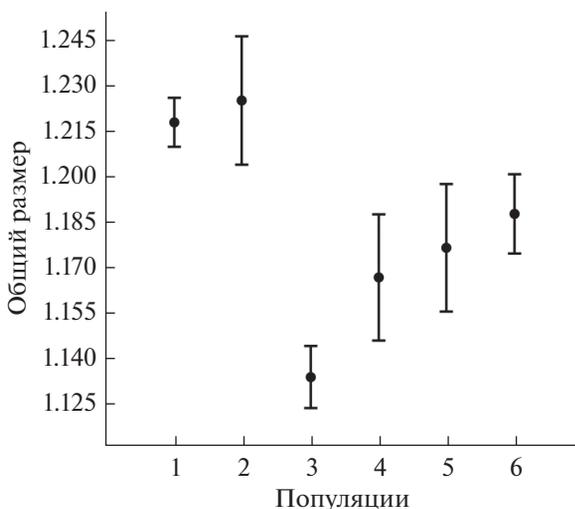
Многомерный дисперсионный анализ переменных формы по 2-м факторам: пола (sex) и географическому (site), выявил высокую значимость обоих факторов при отсутствии значимого взаимодействия между ними (табл. 3). Доля изменчивости,

связанная с полом, невелика и значительно меньше доли межпопуляционной изменчивости.

Таким образом, при анализе комплекса краниальных и одонтологических признаков половой диморфизм либо не значим (общий размер), либо его доля сравнительно мала (переменные формы). Это позволяет при рассмотрении географической изменчивостью пренебречь изменчивостью, связанной с полом животных. Поэтому дальнейший анализ географических различий выполнен на основе однофакторной модели для объединенной выборки самок и животных, пол которых не известен.

**Анализ географической изменчивости общего размера.** При сравнении шести географических выборок пеструшек по общему размеру выявлены высоко значимые различия между ними ( $R^2 = 0.57, F_{5,126} = 33.4, p < 0.001$ ). Попарное сравнение выборок (рис. 3, табл. 4) показало, что наибольшими общими размерами характеризуются особи ширинской и учумской популяций, а наименьшим – особи из окрестностей Карасука. Выборки из Казахстана и Алтая занимают промежуточное положение.

**Анализ географической изменчивости по переменным формы.** Все выборки (за исключением выборки с Зайсана, состоящей из 6 экз.) соответствуют мультиномальному распределению (тест Дорника–Хансена:  $E_p = 49.79, p > 0.05$ ). Тест Бокса показал равенство ковариационных матриц исследуемых выборок (Тест Бокса:  $M = 7931.8, Monte Carlo p = 0.185$ ), что позволяет использование для дальнейшего анализа параметрического дисперсионного и дискриминантного анализов.



**Рис. 3.** Средние значения общего размера и 95% доверительный интервал выборок: 1 – ширинская, 2 – учумская, 3 – карасукская, 4 – алтайская, 5 – кустанайская, 6 – зайсанская.

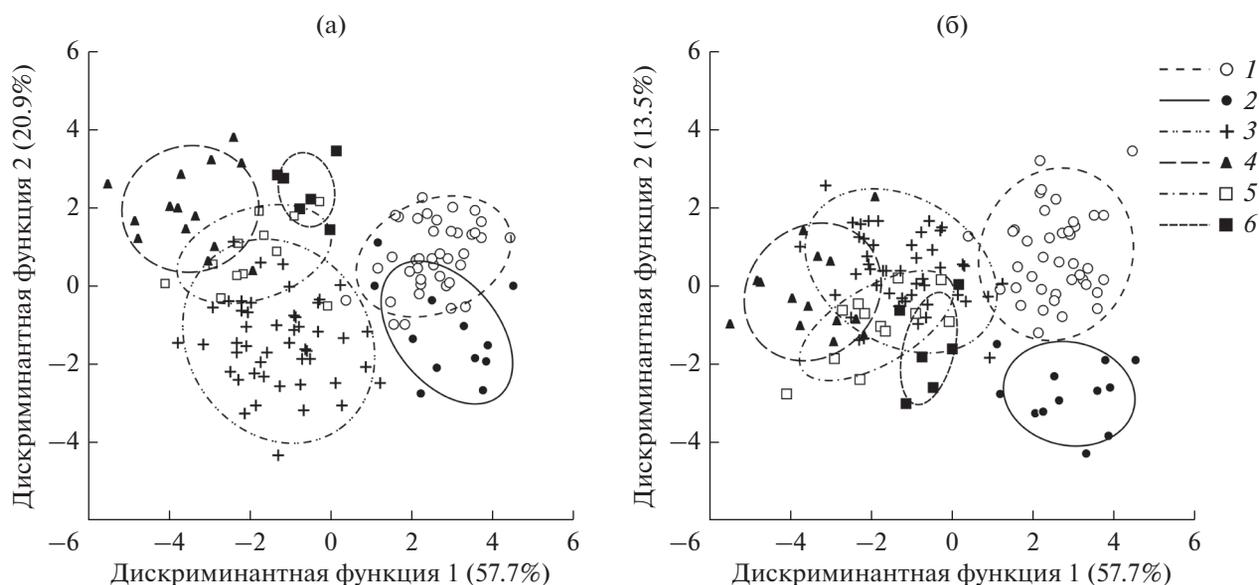


Рис. 4. Расположение географических выборок степной пеструшки в плоскости 1-2 (а) и 1-3 (б) дискриминантных функций: 1 – ширинская, 2 – учумская, 3 – карасукская, 4 – алтайская, 5 – кустанайская, 6 – зайсанская.

По результатам дисперсионного анализа различия между выборками по переменным формы высоко значимы (MANOVA: Wilks's  $\lambda = 0.015$ ,  $F_{90,533} = 8.266$ ,  $p < 0.001$ , част.  $\eta^2 = 0.582$ ). При проведении канонического дискриминантного анализа (рис. 4) наиболее значимыми являются первые три дискриминантные функции, на которые приходится в совокупности 92.1% межгрупповой дисперсии. Все дистанции между выборками высоко значимы при  $p < 0.01$ . Проверке качества классификации с использованием процедуры “складного ножа” показала, что 81.2% особей были правильно отнесены к своей выборке на основании дискриминантных функций (табл. 5). Наименьшее количество ошибок сделано при классификации ширинской и учумской выборок. К “своей” выборке отнесены 97.5 и 83.3% особей этих выборок соответственно, в то время, как качество классификации остальных выборок со-

ставляет 58.3–78.5%, что свидетельствует о большей морфологической обособленности данной географической формы.

Согласно расположению выборок в пространстве дискриминантных функций, учумская и ширинская обособлены от всех остальных выборок вдоль первой оси (рис. 4а). На основании коэффициентов корреляции первой дискриминантной функции с исходными признаками (табл. 6) особи ширинской и учумской выборок характеризуются по сравнению с остальными выборками относительно меньшей длиной лицевого отдела и носовых костей, относительно более короткими верхним и нижним зубными рядами, относительно меньшей высотой затылочной кости. Среди одонтологических признаков наибольшую связь с первой дискриминантной функцией имеют коронарная длина, косая ширина головки и шейки передней непарной петли  $m1$  (табл. 6). Причем

Таблица 5. Результат классификации особей степной пеструшки в дискриминантном анализе на основе переменных формы с использованием процедуры “складного ножа”. По диагонали показано число корректно определенных особей. Недиagonальные элементы указывают количество особей, ошибочно отнесенных к другой выборке. Процент корректно классифицированных особей указан в последнем столбце

| Выборка          | (1)       | (2)       | (3)       | (4)       | (5)      | (6)      | %    |
|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|------|
| Ширинская (1)    | <b>39</b> | 0         | 1         | 0         | 0        | 0        | 97.5 |
| Учумская (2)     | 1         | <b>10</b> | 0         | 0         | 0        | 1        | 83.3 |
| Карасукская (3)  | 1         | 2         | <b>37</b> | 3         | 5        | 0        | 77.1 |
| Алтайская (4)    | 0         | 0         | 1         | <b>11</b> | 2        | 0        | 78.6 |
| Кустанайская (5) | 0         | 0         | 2         | 0         | <b>7</b> | 3        | 58.3 |
| Зайсанская (6)   | 0         | 0         | 0         | 0         | 2        | <b>4</b> | 66.7 |

**Таблица 6.** Коэффициенты корреляции между исходными признаками и дискриминантными функциями (ДФ)

| Признак           | ДФ 1  | ДФ 2  | ДФ 3  |
|-------------------|-------|-------|-------|
| 1. ДКБ            | -0.55 | -0.07 | -0.06 |
| 2. ШС             | -0.48 | -0.06 | 0.18  |
| 3. ДНК            | -0.60 | 0.15  | -0.35 |
| 4. ШМГ            | 0.14  | -0.27 | 0.21  |
| 5. ДЛО            | -0.79 | 0.09  | 0.08  |
| 6. ДМО            | -0.22 | 0.12  | 0.23  |
| 7. ШЗ             | 0.01  | 0.21  | 0.40  |
| 8. ВЗ             | -0.63 | 0.43  | 0.07  |
| 9. ДВД            | -0.14 | 0.56  | -0.09 |
| 10. ДВЗР          | -0.77 | -0.29 | 0.06  |
| 11. ДНД           | 0.56  | 0.24  | -0.24 |
| 12. ДНЗР          | -0.79 | 0.18  | 0.18  |
| 13. ДК <i>m l</i> | -0.63 | -0.37 | 0.28  |
| 14. ДПО           | -0.05 | -0.15 | 0.24  |
| 15. ДПНП          | 0.04  | 0.09  | -0.03 |
| 16. ШНГ           | -0.30 | -0.14 | 0.01  |
| 17. КСПНП         | 0.14  | -0.36 | 0.07  |
| 18. КШГПНП        | 0.48  | -0.03 | -0.69 |
| 19. КШШПНП        | 0.49  | -0.05 | 0.31  |

особи ширинской и учумской популяций отличаются относительно большей коронарной длиной и относительно меньшей шириной головки и шейки передней непарной петли.

Вдоль второй оси наибольшие различия проявляются между карасукской и алтайской популяциями. Выборки из Казахстана занимают между ними промежуточное положение, при этом группа особей из окрестностей оз. Зайсан хорошо обособлена в плоскости 1 и 2 осей от большинства выборок, перекрываясь только со второй выборкой из Казахстана. Согласно коэффициентам корреляции признаков со второй дискриминантной функцией (табл. 6) особи карасукской выборки характеризуются по сравнению с алтайской и казахскими выборками относительно меньшей длиной верхней диастемы и относительно большей высотой затылочной кости, относительно большими коронарной длиной и косой шириной передней непарной петли.

По третьей оси выявляются значительные различия между учумской и ширинской выборками, в то время как все остальные выборки перекрываются (рис. 4б). Согласно коэффициентам корреляции признаков с третьей дискриминантной функцией (табл. 6) особи ширинской популяции отличаются от особей учумской популяции главным

образом относительно большей шириной головки передней непарной петли *m l*.

Кластерный анализ позволяет суммировать информацию по всем дискриминантным функциям и дать визуальную оценку сходства/различия между географическими выборками на основе дистанций Махаланобиса, вычисленной при проведении дискриминантного анализа. Как видно на рис. 5 все выборки разделились на два кластера. Один кластер объединяет учумскую и ширинскую популяции. Второй кластер включает выборки карасукской, алтайской, зайсанской и кустанайской популяций степной пеструшки. При этом наиболее сходными оказались карасукская и кустанайская выборки, животные которых обитают в северо-восточной части основного ареала (рис. 1).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенный анализ географической изменчивости краниальных и дентальных признаков степной пеструшки показал, что значимые различия проявляются в размерах и форме черепа. Что касается признаков первого нижнекоренного зуба, то они вносят меньший вклад в межпопуляционную изменчивость. Карасукская популяция характеризуется меньшими размерами относительно других, а наиболее крупные размеры показывают учумская и ширинская популяции (рис. 3). Наиболее существенными признаками в дискриминацию выборок по форме черепа вносят длина лицевого отдела, носовых костей, нижнего и верхнего зубного ряда, высота затылочной кости. Среди одонтологических признаков наиболее значимы такие признаки как коронарная длина, косая ширина головки и шейки передней непарной петли *m l* (табл. 5). В основном по этим признакам ширинская и учумская популяции отличаются от четырех других популяций.

Как известно для вида описано четыре подвида: *lagurus* (уральский), *abacanicus* (минусинский), *aggressus* (темный), *altorum* (светлый) (Огнев, 1950; Громов, Ербаева, 1995). Минусинский подвид *abacanicus* является самым восточным, распространен в Хакасии и в окрестностях Минусинска, между Абаканским хребтом с запада и р. Енисей, Саянами с востока. Распространение подвида ограничено кольцом горной тайги, в которую зверьки не проникают и таким образом его популяции изолированы от основного видового ареала. Наиболее широко распространен подвид *lagurus*, ареал которого включает Украину, юг европейской части России, Южный Урал, Казахстан, Алтайские и Кулундинские степи. Подвид *aggressus* распространен в Рязанской, в северной части Саратовской и Оренбургской областей, в северной части Кустанайской области (Громов, Ербаева, 1995). Граница между подвидами *lagurus* и *aggressus* не выявлена и очень часто пеструшек трудно отне-

сти к той или иной форме (Огнев, 1950; Громов, Поляков, 1977). Самый южный подвид *altorum* обитает в горах и предгорьях Центральной Азии (Убсу-Нурская котловина), Китай.

Отличия между подвидами описаны, в основном, по окраске меха, а размеры тела, хвоста и ступни чаще всего перекрываются (Огнев, 1950). Как известно, изменчивость окраски меха у зверьков разных местообитаний, в разные сезоны года, различного возраста может превышать подвидовую, то встает вопрос о таксономической надежности этого признака. По другим признакам, таким как размеры, форма черепа и моляров, отличия между подвидами не изучены (Абрамсон, Лисовский, 2012). У вида диплоидный набор хромосом равен 54, коренные зубы без корней и без цемента (Громов, Ербаева, 1995).

Судя по географическому положению выборок, они относятся к трем подвидам. В систематической сводке Огнева (1950) приводится следующая характеристика. Подвид *abacanicus*: длина тела 95–120 мм, хвоста 11–14 мм, задней ступни 13–15 мм. Летний мех на спине светлый сероватый с палевой примесью, черная полоса на спине отчетлива, брюшко серое с желтизной и рыжиной. Хвост короткий белесо-желтоватый с длинной кистью волос. Приводятся данные о значении краниологических признаков, но по каким признакам черепа он отличается от всех остальных непонятно (Огнев, 1950). Уральский подвид *lagurus* (номинативный): длина тела 91–115 мм, длина хвоста 9–13.1 мм, длина задней ступни 12–14.3 мм. Летний спинной мех бледный, палево-серый, часто с примесью легкой рыжины, полоска на спине узкая темно-серого или серо-бурого тона. Брюшная область серовато-белесая с желтизной. Хвост одноцветный белесый с оттенком желтизны, короткий с кисточкой. Подвид *aggressus* – самый темный подвид, цвет спинного меха серее, брюхо белесое, с легкой примесью серого оттенка и с желтоватым налетом. Хвост одноцветный, белесо-желтоватый с относительно длинной кисточкой на конце. Размеры тела не отличаются от уральского подвида. По приведенным выше описаниям подвидам трудно выделить четкие критерии различий между ними, а признаки черепа, по которым они отличались бы, не приводятся.

Если выявленную нами географическую изменчивость шести популяций степной пеструшки по признакам черепа и зуба сопоставить с подвидовой систематикой, то можно сделать следующие заключения. Ширинская и учумская популяции, животные которых обитают в Чулымо-Енисейской котловине и отличаются от всех остальных, соответствуют подвиду *abacanicus*. Все остальные популяции относятся к подвиду *lagurus*. По размерам черепа подвид *abacanicus* значимо крупнее других форм, и пропорции черепа отличаются от

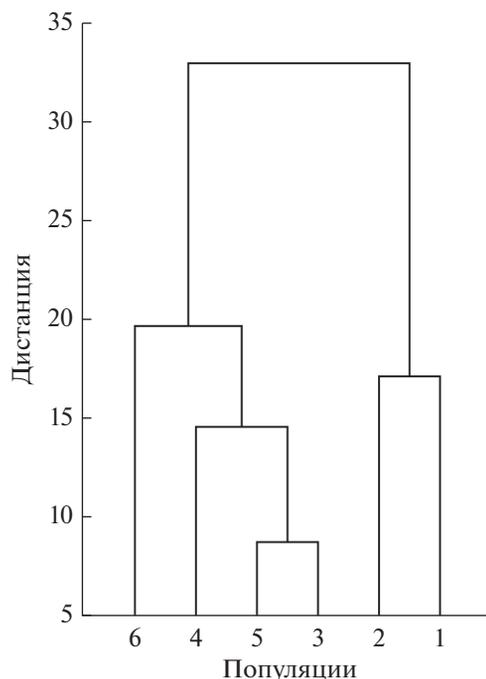


Рис. 5. Сходство выборок степной пеструшки на основе дистанции Махаланобиса. 1 – ширинская, 2 – учумская, 3 – карасукская, 4 – алтайская, 5 – кустонайская, 6 – зайсанская.

номинативного подвида. Пеструшки подвида *abacanicus* характеризуются относительно меньшей длиной лицевого отдела, носовых костей, нижнего и верхнего зубного ряда, а также меньшей затылочной высотой.

Известно, что количественные признаки черепа и нижней челюсти характеризуются высокой наследуемостью (Atchley *et al.*, 1981; Sparks, Jantz, 2002; Efimov *et al.*, 2005). При этом характеристики формы как правило связаны с несколькими локусами количественных признаков (Birdsall *et al.*, 2000; Zimmerman *et al.*, 2000; Klingenberg *et al.*, 2001; Chase *et al.*, 2002; Workman *et al.*, 2002). Таким образом, различия формы, обнаруженные в этом исследовании, позволяют предположить, что пеструшки из разных популяций генетически отличаются друг от друга по соответствующим локусам признаков. Сочетание уменьшенного потока генов между участками ареала, связанного с увеличением расстояния между ними, и дрейфа во время колебаний численности часто служит приемлемым объяснением морфологических различий. Выявленный нами уровень морфологической дифференциации между популяциями степной пеструшки, тем не менее, не всегда согласуется с моделью изоляции расстояния (Wright, 1943). Так, наиболее сходными по форме оказались значительно удаленные друг от друга популяции, карасукская и кустонайская, в то время, как географически более близкие к карасукской, учумская и

ширинская популяции, значительно отличаются как по размерам, так и по форме черепа. Скорее всего, морфологические особенности минусинского подвида связаны с полной изоляцией от основного ареала. О высокой степени дивергенции говорит тот факт, что подвид *abacanicus* по сравнению с другими подвидами обладает более низким уровнем обмена веществ, более высокой химической терморегуляцией, меньшей амплитудой изменчивости температуры тела и потребления кислорода (Гладкина, Мейер, 1963; Гладкина, 1972). Вероятно, эти сохранившиеся до настоящего времени эколого-физиологические особенности были характерны для животных холодных перигляциальных степей. По палеонтологическим данным известно, что в позднем плейстоцене степная пеструшка была многочисленной на территории Евразии (рис. 1). Изучение ископаемых остатков степной пеструшки показало, что коронарная длина *m1* увеличивалась от среднего до первой половины позднего плейстоцена, а в дальнейшем уменьшалась до современных форм. Причем эти изменения связывают с адаптацией к палеоклиматическим условиям (Струкова, 2002).

Карасукская, алтайская, кустанайская и зайсанская популяции, среди которых самой мелкой формой является карасукская, относятся к уральскому подвиду *lagurus*. Пеструшки карасукской популяции обитают на северо-восточной границе основного ареала, где распространены мозаично и численность их невелика (Дупал, 2008, 2014). Возможно, морфологические особенности карасукской популяции объясняются краевым эффектом, который встречается у географически разобщенных популяций грызунов (Васильев и др., 2004).

\* \* \*

Применение многомерного статистического анализа при исследовании морфометрических признаков степной пеструшки показало, что доля изменчивости связанной с полом невелика и значительно меньше доли межпопуляционной изменчивости, что позволило не учитывать половые различия при анализе географических различий.

Как известно, изоляция влияет на дифференциацию популяций и может приводить к разнообразным морфологическим ответам на действие отбора. Показано, что изолированные популяции степной пеструшки из Чулымо-Енисейской впадины характеризуются крупными размерами черепа и особенностями формы, и отличаются от животных из Западной Сибири и Казахстана. Возможно, эти популяции сохранились на данной территории с конца плейстоцена. В это время в северной части Азии были распространены перигляциальные холодные степи. Адаптация животных к низким температурам проявилась в увеличении

размеров, изменении фенотипа. Степные пеструшки с этой территории относятся к подвиду *abacanicus*. Причем ареал этого подвида значительно сократился за последние 10 тыс. лет. Среди популяций уральского подвида наиболее мелкой формой является карасукская популяция. Возможно, уменьшение размеров к периферии ареала в большей степени связано с факторами среды, где большое значение имеет мозаичность местообитаний и невысокая численность *L. lagurus* в Кулундинской степи.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках Программы фундаментальных научных исследований (ФНИ) государственной академии наук на 2021–2025 гг. (проект 122011800263-6).

**Соблюдение этики в работе с животными.** Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией, с соблюдением руководящих требований приказа Министерства высшего и среднего образования Российской Федерации (№ 742 от 13 ноября 1984 г.) и Федерального закона Российской Федерации (от 19.12.2018 № 498-ФЗ). Полевые процедуры и протоколы были одобрены Институциональными комитетами по уходу и использованию животных Института систематики и экологии животных (протокол 2020-02, 2021-01). В исследовании не участвовали исчезающие или охраняемые виды.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абрамсон Н.И., Лисовский А.А. Подсемейство Arvicolinae // Млекопитающие России: систематико-географический справочник. Сб. тр. Зоол. музея МГУ. Т. 52. / под ред. Павлинова И.Я., Лисовского А.А. М.: Т-во науч. изд. КМК. 2012. С. 220–276.
- Васильев А.Г., Фалеев В.И., Галактионов Ю.К., Ковалева В.Ю., Ефимов В.М., Епифанцева Л.Ю., Поздняков А.А., Дупал Т.А., Абрамов С.А. Реализация морфологического разнообразия в природных популяциях млекопитающих (2-е изд. испр.). Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2004. 232 с.
- Волкова И.С., Архипов С.А., Бабушкин А.Е., Кулькова И.А., Гуськов С.А., Кузьмина О.Е., Левчук Л.К., Михайлова И.В., Сухорукова С.С. Стратиграфия нефтегазовых районов Западной Сибири. Кайнозой Западной Сибири. Новосибирск: СО РАН. 2002. 243 с.
- Гладкина Т.С. Межвидовые и внутривидовые особенности терморегуляции серых полевков и степной пеструшки // Тез. докл. 5-ой Всесоюз. эколого-физиологической конференции. Новосибирск: 1972. С. 14–16.
- Гладкина Т.С., Мейер М.Н. Влияние летних условий на состояние степной пеструшки и узкочерепной полевки в Северном Казахстане // Тр. Всес. научно-исслед. ин-та защиты растений. Л.: 1963. Вып. 18. С. 153–173.
- Громов И.М., Ербаева М.А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. СПб. Л.: Зоол. ин-т, 1995. 520 с.

- Громов И.М., Поляков И.Я. Полевки (Microtinae). Фауна СССР. Млекопитающие / Под ред. Скарлато О.А. Л.: Наука, 1977. Т. 3. 504 с.
- Дупал Т.А. Популяционная динамика и изменения структуры сообществ мелких млекопитающих Северной Кулунды // Зоол. журн. 2008. Т. 87. № 5. С. 609–613.
- Дупал Т.А. Распространение, численность и структура популяции степной пеструшки (*Lagurus lagurus*, Rodentia, Arvicolinae) на периферии ареала // Зоол. журн. 2014. Т. 93. № 12. С. 1454–1460. <https://doi.org/10.7868/S0044513414120071>
- Ковалева В.Ю., Абрамов С.А., Дупал Т.А., Ефимов В.М., Литвинов Ю.Н. Анализ соответствия и комбинирование молекулярно-генетических и морфологических данных в зоологической систематике // Изв. РАН. Сер. биол. 2012. № 4. С. 404–414.
- Косинцев П.А., Бобковская Н.Е., Бородин А.В., Зиновьев Е.В., Некрасов А.И., Трофимова С.С. Трогоптериевый слон Нижнего Иртыша. Екатеринбург: Изд-во Волот, 2004. 260 с.
- Майр Э. Популяции, виды и эволюция. М.: Мир. 1974. 457 с.
- Майр Э. Принципы зоологической систематики. М.: Мир. 1971. 454с.
- Млекопитающие Казахстана. В 4-х томах. Т. 1. Ч. 3. Алма-Ата: Наука КазССР, 1978. 492 с.
- Огнев С.И. Звери СССР и прилежащих стран (звери Восточной Европы и Северной Азии). М.-Л.: Изд-во АН СССР. 1950. Т. 7. 706 с.
- Поздняков А.А., Сенотрусова М.М. Анализ морфотипической изменчивости степной пеструшки // Бюл. МОИП, отд. биол. 2006. Т. 111. Вып. 3. С. 18–23.
- Струкова Т.В. Степная пеструшка (*Lagurus lagurus* Pall.) и узкочерепная полевка (*Microtus gregalis* Pall.) в четвертичных фаунах Среднего и Южного Зауралья: Автореф. дис. канд. биол. наук. Екатеринбург: ЦМИК, 2002. 24 с.
- Тушикова Н.В., Каледа Л.В. Определение возраста грызунов // Фауна и экология грызунов. 1957. Вып. 5. С. 119–154.
- Шварц С.С. Экологические закономерности эволюции. М.: Наука. 1980. 276 с.
- Atchley W., Rutledge J., Cowley D. Genetic components of size and shape. II. Multivariate covariance patterns in the rat and mouse skull // *Evolution*. 1981. V. 35(6). P. 1037–1055. <https://doi.org/10.2307/2408119>
- Birdsall K., Zimmerman E., Teeter K., Gibson G. Genetic variation for the positioning of wing veins in *Drosophila melanogaster* // *Evol. Dev.* 2000. V. 2(1). P. 16–24. <https://doi.org/10.1046/j.1525-142x.2000.00034.x>
- Box G.E.P. A general distribution theory for a class of likelihood criteria // *Biometrika*. 1949, V. 36(3–4). P. 317–346. <https://doi.org/10.2307/2332671>
- Bronner G.N., van der Merwe M., Njobe K. Nongeographic cranial variation in two medically important rodents from South Africa, *Mastomys natalensis* and *Mastomys coucha* // *J. Mammalogy*. 2007. V. 88(5). P. 1179–1194. <https://doi.org/10.1644/06-MAMM-A-439R.1>
- Chase K., Carrier D.R., Adler F.R., Jarvik T., Ostrander E.A., Lorentzen E.D., Lark K.G. Genetic basis for systems of skeletal quantitative traits: Principal component analysis of the canid skeleton // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2002. V. 99(15). P. 9930–9935. <https://doi.org/10.1073/pnas.152333099>
- Claude J. Log-shape ratios, procrustes superimposition, elliptic Fourier analysis: three worked examples in R // *Hystrix*. 2013. V. 24(1). P. 94–102. <https://doi.org/10.4404/hystrix-24.1-6316>
- Doornik J.A., Hansen H. An omnibus test for univariate and multivariate normality\* // *Oxf. Bull. Econ. Stat.* 2008. V. 70. P. 927–939. <https://doi.org/10.1111/j.1468-0084.2008.00537.x>
- Efimov V., Kovaleva V., Markel A. A new approach to the study of genetic variability of complex characters // *Heredity*. 2005. V. 94(1). P. 101–107. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800580>
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // *Paleontol. Electron.* 2001. V. 4(1), art.4. 9 p. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm).
- Jungers W.L., Falsetti A.B., Wall C.E. Shape, relative size, and size-adjustments in morphometrics // *Am. J. Phys. Anthropol.* 1995. V. 38. P. 137–161. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330380608>
- Klecka W. Discriminant Analysis // Sage University Paper Series on Quantitative applications in the Social Sciences, Ser. 07-019. Beverly Hills/London, 1980. 72 p. <https://doi.org/10.4135/9781412983938>
- Klingenberg C.P., Leamy L.J., Routman E.J., Cheverud J.M. Genetic architecture of mandible shape in mice: Effects of quantitative trait loci analyzed by geometric morphometrics // *Genetics*. 2001. V. 157(2). P. 785–802. <https://doi.org/10.1093/genetics/157.2.785>
- Lague M.R., Jungers W.L. Morphometric variation in Plio-Pleistocene hominid distal humeri // *Am. J. Phys. Anthropol.* 1996. V. 101. P. 401–427. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8644\(199611\)101:3<401::AID-AJPA8>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8644(199611)101:3<401::AID-AJPA8>3.0.CO;2-0)
- Leamy L. Variance partitioning and effects of sex and age on morphometric traits in random bred house mice // *J. Mammalogy*. 1983. V. 64(1). P. 55–61. <https://doi.org/10.2307/1380750>
- Levene H. Robust tests for equality of variances // *Contributions to probability and statistics* / Eds Olkin I., Ghurye S.G., Hoefding W., Madow W.G., Munn H.B. Stanford Univ. Press, 1960. P. 278–292.
- Mosimann J.E. Size allometry: size and shape variables with characterizations of the lognormal and generalized gamma distributions // *J. Am. Stat. Assoc.* 1970. V. 65. P. 930–948. <https://doi.org/10.1080/01621459.1970.10481136>
- Schulte-Hostedde A.I. Sexual size dimorphism in rodents // *Rodent Societies: An Ecological and Evolutionary Perspective* / Eds Wolff J.O., Sherman P.W. University of Chicago Press, 2008. P. 115–128.
- Shakleton N.J., Opdyke N.D. Oxydegen isotope and paleomagnetic evidence for early Northern Hemisphere glaciation // *Nature*. 1977. V. 270. № 5634. P. 216–219. <https://doi.org/10.1038/270216a0>

- Shapiro S.S., Wilk M.B.* An analysis of variance test for normality (complete samples) // *Biometrika*. 1965. V. 52(3–4). P. 591–611.  
<https://doi.org/10.2307/2333709>
- Shenbrot G.I., Krasnov B.R.* An atlas of the geographic distribution of the arvicoline rodents of the world (Rodentia, Muridae: Arvicolinae). Sofia-Moscow: Pensoft. 2005. 336 p.
- Sparks C.S., Jantz R.L.* A reassessment of human cranial plasticity: Boas revisited // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002. V. 99(23). P. 14636–14639.  
<https://doi.org/doi:10.1073/pnas.222389599>
- Workman M.S., Leamy L.J., Routman E.J., Cheverud J.* Analysis of quantitative trait locus effects on the size and shape of mandibular molars in mice // *Genetics*. 2002. V. 160(4). P. 1573–1586.
- Wright S.* Isolation by distance // *Genetics*. 1943. V. 28(2). P. 114–138.  
<https://doi.org/10.1093/genetics/28.2.114>
- Zimmerman E., Palsson A., Gibson G.* Quantitative trait loci affection components of wing shape in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 2000. V. 155(2). P. 671–683.

## Morphological Variability of the Steppe Lemming (*Lagurus lagurus* Pall.) in the Northeast of the Species Range

T. A. Dupal<sup>1, #</sup>, S. A. Abramov<sup>1</sup>, and Yu. N. Litvinov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Systematics and Ecology of Animals, Siberian Branch of the RAS, ul. Frunze 11, Novosibirsk, 630091 Russia*

<sup>#</sup> *e-mail: gf@eco.nsc.ru*

The variability of 12 cranial and 7 dental characters of adult steppe lemmings from 6 populations in the north-east of the species range was investigated using multivariate statistical analysis. The level of interpopulation differences in size and shape of the skull significantly exceeds the level of sex differences. Isolated populations of the steppe lemming from the Chulym-Yenisei depression are larger in skull size compared to animals from Western Siberia and Kazakhstan, as well as a relatively shorter facial and nasal length, relatively shorter maxillary and mandibular tooth rows, and shorter occipital bone height. The animals from the Karasuk population are characterized by the smallest skull size. Comparison of the geographic differences between the samples to subspecies taxonomy let us assign the steppe lemmings from the Chulym-Yenisei depression to the subspecies *abacanicus*, and all others to the subspecies *lagurus*.

*Keywords:* *Lagurus lagurus*, geographical variability, subspecies, Siberia, Kazakhstan, craniometry

УДК 591.4:575.1:599.742.4(282.256)

## МОРФО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КОЛОНКА (*Mustela sibirica* PALL.) НА СЕВЕРО-ВОСТОЧНОЙ ОКРАИНЕ АРЕАЛА (БАССЕЙН СРЕДНЕЙ ЛЕНЫ, ЯКУТИЯ)

© 2022 г. Е. С. Захаров\*, \*\*, @, В. М. Сафронов\*, Н. Н. Захарова\*\*, Л. А. Пестрякова\*\*,  
Л. П. Корякина\*\*\*, S. Kruse\*\*\*\*, Н. А. Бочкарев\*\*\*\*\*

\*Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, проспект Ленина 41, Якутск, 677980 Россия

\*\*Институт естественных наук СВФУ им. М.К. Аммосова, ул. Кулаковского 58, Якутск, 677000 Россия

\*\*\*Арктический государственный агротехнологический университет, Сергеляхское шоссе 3, Якутск, 677007 Россия

\*\*\*\*Институт полярных и морских исследований им. Альфреда Вегенера,  
Телеграфенберг А45, Потсдам, 14473 Германия

\*\*\*\*\*Институт систематики и экологии животных СО РАН, ул. Фрунзе, 11, Новосибирск, 630091 Россия

@E-mail: zevsable@gmail.com

Поступила в редакцию 07.06.2021 г.

После доработки 08.11.2021 г.

Принята к публикации 20.12.2021 г.

Рассмотрены половые и возрастные различия колонка по морфологическим признакам, оценена величина полового диморфизма по основным размерным характеристикам. Выявлено высокое гаплотипическое разнообразие и пониженный уровень нуклеотидного разнообразия колонка в Якутии. Установлены сходство якутского и западносибирского колонков по комплексу морфо-генетических признаков и их отличия от дальневосточного подвида, включая изменчивость фрагмента гена цитохром *b* мтДНК. Построена медианная сеть гаплотипов колонка, характеризующая филогенетические взаимоотношения между популяциями. Показаны возможные пути и последовательность расселения колонка в Северной Азии

**Ключевые слова:** колонок, подвид, морфология, мтДНК, генетическая структура

**DOI:** 10.31857/S1026347022060154

Колонок широко распространен в Северной, Южной и Юго-Восточной Азии. В мировом ареале колонка описано 14 подвигов (Ellerman *et al.*, 1951). На территории России встречаются два подвида — сибирский (*Mustela sibirica* Pallas, 1773) и дальневосточный (*Mustela sibirica manchurica* Pallas, 1911). Первый из них населяет восточную часть европейской части страны и Сибирь, второй — Приамурье и Приморье (Гептнер и др., 1967). Относительно светлый мех и мелкие размеры колонка на территории Якутии несколько отличали его от сибирской формы вида (Строганов, 1962). Позднее по размерам тела и черепа он был отнесен к номинальному подвиду (*M. s. sibirica*) с некоторыми отклонениями в структуре и окраске меха (Гептнер и др., 1967; Тавровский и др., 1971). Ареал колонка в Якутии охватывает Лено-Вилюйское и Лено-Амгинское междуречья и бассейны рр. Алдан и Олекма. Северная граница распространения проходит по левобережному бассейну р. Вилюй, восточная — по западным и южным отрогам Верхоянского хребта. Наибольшая плотность вида приурочена к долине р. Лены и бассейну р. Амга в

пределах Центральной Якутии. Южнее административной границы Якутии и Станового хребта сибирский подвид заходит до бассейна р. Зея, где его сменяет более крупный дальневосточный подвид (Новиков, 1956; Бромлей и др., 1984). В данном сообщении охарактеризованы морфо-генетические отличия якутского колонка от западносибирских и дальневосточных популяций вида, показана изменчивость митохондриальной ДНК, филогения, история заселения видом территории Якутии.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основу статьи составляют морфометрические исследования 77 тушек колонка, собранных в бассейне средней Лены в 2003–2018 гг. Дополнительно были измерены 53 черепа колонков Центральной Якутии из зоологической коллекции Института биологических проблем криолитозоны СО РАН за 1950–1980 гг. Приведены промеры 124 черепов колонка из Западной Сибири, 16 черепов из бассейна р. Амур, 3 — из Забайкалья, 1 — из бас-

сейне р. Кама, хранящихся в зоологическом музее Института систематики и экологии животных СО РАН (г. Новосибирск). Масса тела дана по тушкам без шкур. Для краниологической характеристики использованы 8 признаков: кондиллобазальная длина, общая длина, основная длина, длина лицевого отдела, длина мозгового отдела, скуловая ширина, межглазничная ширина, мастиоидная ширина. Возраст определяли по числу годовых слоев в цементе клыка (Клевезаль, 2007).

Степень полового диморфизма оценивали в процентах по формуле  $D = X_{\sigma} - X_{\phi} / X_{\phi} \times 100$ , где  $D$  – величина полового диморфизма,  $X_{\sigma}$  и  $X_{\phi}$  – средние величины признаков для самцов и самок (Павлинов, Россолимо, 1974).

Статистический анализ и визуализацию проводили в программной среде для статистических вычислений R-Project функция 'hclust', использовали метод минимальной дисперсии Уорда для поиска компактных сферических кластеров (<https://www.rdocumentation.org/packages/stats/versions/3.6.2/topics/hclust>).

Выделение ДНК проводили фенольно-хлороформным методом из фиксированной в 96%-ом этаноле мышечной ткани (Sambrook *et al.*, 1989). Выделенную ДНК хранили при температуре 4°C. Выполнен анализ изменчивости первой субъединицы гена цитохром *b* мт ДНК, амплифицированного в полимеразной цепной реакции с использованием разработанных внешних праймеров MmarL1 5'-GACAAAATCCCATTCACACC-3' Forward и MmarH1 5'-GTAATTA ATATACTACAAAGACTCTTCATTT-3' Reverse. Амплификацию фрагмента проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл. Программа амплификации фрагмента цитохрома *b* включала этап первоначальной денатурации ДНК: +95°C – 5 мин; 32 цикла синтеза фрагмента: +95°C – 1 мин, +56°C – 50 с, +72°C – 1 мин 15 с; заключительный этап достройки концов: +72°C – 5 мин. В результате амплификации фрагмента гена были получены последовательности длиной в 600 нуклеотидных оснований (н.о.). Полученные ПЦР продукты очищали с помощью набора реактивов “БИОСИЛИКА” (Новосибирск, Россия) и секвенировали по прямому и обратному праймерам на автоматическом анализаторе ABI 3130xl Genetic Analyser (“Applied Biosystems”) в компании “Синтол”. Затем нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью алгоритма ClustalW и редактировали вручную. Полученные последовательности были депонированы в базу данных GenBank и их номера приведены в табл. 1.

Для выявления полиморфизма нуклеотидных последовательностей использовали следующие параметры: число полиморфных (сегрегирующих) сайтов ( $S$ ), число гаплотипов ( $h$ ), разнообразие гаплотипов ( $H_d$ ), нуклеотидное разнообразие ( $\pi$ ), среднее число нуклеотидных различий ( $k$ ). Все

расчеты выполняли в программе DnaSP v. 5.10 (Librado, Rozas, 2009). Кроме собственного материала из бассейнов среднего течения р. Лены (Центральная Якутия) и верхнего течения р. Бия (Республика Алтай) в генетический анализ включены данные по нуклеотидным последовательностям у колонка в других частях ареала из базы данных GenBank NCBI (табл. 1). Географическое распространение использованных в работе гаплотипов колонка показано на рис. 1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Половые и возрастные различия морфологических признаков колонка в Якутии мало изучены. Величина полового диморфизма колонков в возрасте до 1 года (7–10 мес) по массе тела составляла 62.9%, по длине – 14.1%. У взрослых зверьков межполовые различия выражены резко. По длине тела они достигали 19.3%. По массе взрослые самцы были, в среднем, в 2.2 раза тяжелее взрослых самок (табл. 2). Молодые самки уступали взрослым самкам по массе и длине тела на 4 и 2%. У молодых и взрослых самцов эти показатели отличались на 28 и 6% соответственно, свидетельствуя о большей продолжительности весового и линейного роста у самцов-сеголетков, чем у одновозрастных самок. По длине стопы и хвоста молодые и взрослые зверьки практически не отличались.

По большинству краниологических показателей молодые и взрослые самцы статистически значительно превосходили одновозрастных самок ( $p < 0.01$ ). Величина полового диморфизма увеличивалась с возрастом. По кондиллобазальной длине у молодых самцов и самок она составляла 11.2%, у взрослых – 16.3%, по скуловой ширине соответственно 14.0 и 20.9%. Возрастные различия по промерам черепа среди самок не отмечены. Размеры черепа взрослых самцов по шести признакам из восьми были больше, чем у молодых самцов ( $p < 0.01$ ), что, как и приведенные выше данные по массе и длине тела, указывает на их более длительный рост в сравнении с самками (табл. 3).

Сравнение средних показателей размеров черепа колонка из бассейнов рр. Лены, Амура и Западной Сибири показало, что в обеих половых группах среднененские зверьки более сходны с западносибирскими, менее – с амурскими. Малочисленная выборка черепов из Забайкалья не использовалась в данном анализе.

Результаты кластерного анализа краниологических показателей самцов и самок из пяти географических популяций колонка демонстрируют дендрограммы, показанные на рис. 2. Среди самок в основании дендрограммы расположились амурские и забайкальские зверьки, средненен-

Таблица 1. Данные по гаплотипам выборки колонка

| Гаплотип | Номер регистрации в Генбанке     | Район отбора проб                   | Источник                     |
|----------|----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| Нар_1    | AP017418<br>AP017395-AP017396    | Забайкалье<br>Урал                  | Shalabi <i>et al.</i> , 2016 |
|          | MZ269423                         | Якутия                              | Наши данные                  |
|          | MZ269425                         | Якутия                              |                              |
|          | MZ269426                         | Якутия                              |                              |
|          | MZ269428                         | Якутия                              |                              |
|          | MZ269429                         | Якутия                              |                              |
|          | MZ269432                         | Якутия                              |                              |
|          | MZ269433                         | Якутия                              |                              |
|          | MZ269438                         | Якутия                              |                              |
|          | MZ269443                         | Якутия                              |                              |
|          | MZ269445                         | Алтай                               |                              |
|          | MZ269446                         | Алтай                               |                              |
|          | MZ269447                         | Алтай                               |                              |
|          | MZ269448                         | Алтай                               |                              |
|          | MZ269449                         | Алтай                               |                              |
| MZ269450 | Алтай                            |                                     |                              |
| MZ269451 | Алтай                            |                                     |                              |
| Нар_2    | AP017419-AP017421<br>AP017397    | Япония (Цусима)<br>Япония (Цусима)  | Shalabi <i>et al.</i> , 2016 |
|          | JQ739197<br>JQ739196<br>JQ739194 | п-в Корея<br>п-в Корея<br>п-в Корея | Koh <i>et al.</i> , 2012     |
|          | AB564132                         | басс. р. Амур                       | Hosoda <i>et al.</i> , 2011  |
|          | Нар_3                            | AP017417<br>AP017394                | Забайкалье<br>Забайкалье     |
| Нар_4    | JQ739195                         | п-в Корея                           | Koh <i>et al.</i> , 2012     |
| Нар_5    | JQ739193                         | п-в Корея                           | Koh <i>et al.</i> , 2012     |
| Нар_6    | JQ739191                         | п-в Корея                           | Koh <i>et al.</i> , 2012     |
| Нар_7    | JQ739190                         | п-в Корея                           | Koh <i>et al.</i> , 2012     |
| Нар_8    | AB564131                         | басс. р. Амур                       | Hosoda <i>et al.</i> , 2011  |
| Нар_9    | JQ739192<br>JQ739189             | п-в Корея<br>п-в Корея              | Koh <i>et al.</i> , 2012     |
|          | Нар_10                           | AB564135                            |                              |
| Нар_11   | JQ739198                         | п-в Корея                           | Koh <i>et al.</i> , 2012     |
| Нар_12   | JQ739188                         | п-в Корея                           | Koh <i>et al.</i> , 2012     |
| Нар_13   | AP017413- AP017416<br>AP017393   | о. Тайвань<br>п-в Корея             | Shalabi <i>et al.</i> , 2016 |
|          | AB051243                         | о. Тайвань                          | Hosoda <i>et al.</i> , 2000  |
| Нар_14   | AB026108                         | Япония (Киото)                      | Kurose <i>et al.</i> , 2000  |

Таблица 1. Окончание

| Гаплотип | Номер регистрации в Генбанке   | Район отбора проб  | Источник    |
|----------|--|--|-------------|
| Нар_15   | MZ269424<br>MZ269427<br>MZ269434<br>MZ269435<br>MZ269436<br>MZ269440<br>MZ269441<br>MZ269444 | Якутия<br>Якутия<br>Якутия<br>Якутия<br>Якутия<br>Якутия<br>Якутия<br>Якутия | Наши данные |
| Нар_16   | MZ269430<br>MZ269431   | Якутия<br>Якутия   | Наши данные |
| Нар_17   | MZ269437   | Якутия   | Наши данные |
| Нар_18   | MZ269439<br>MZ269442   | Якутия<br>Якутия   | Наши данные |

Таблица 2. Морфологические показатели колонка в Якутии

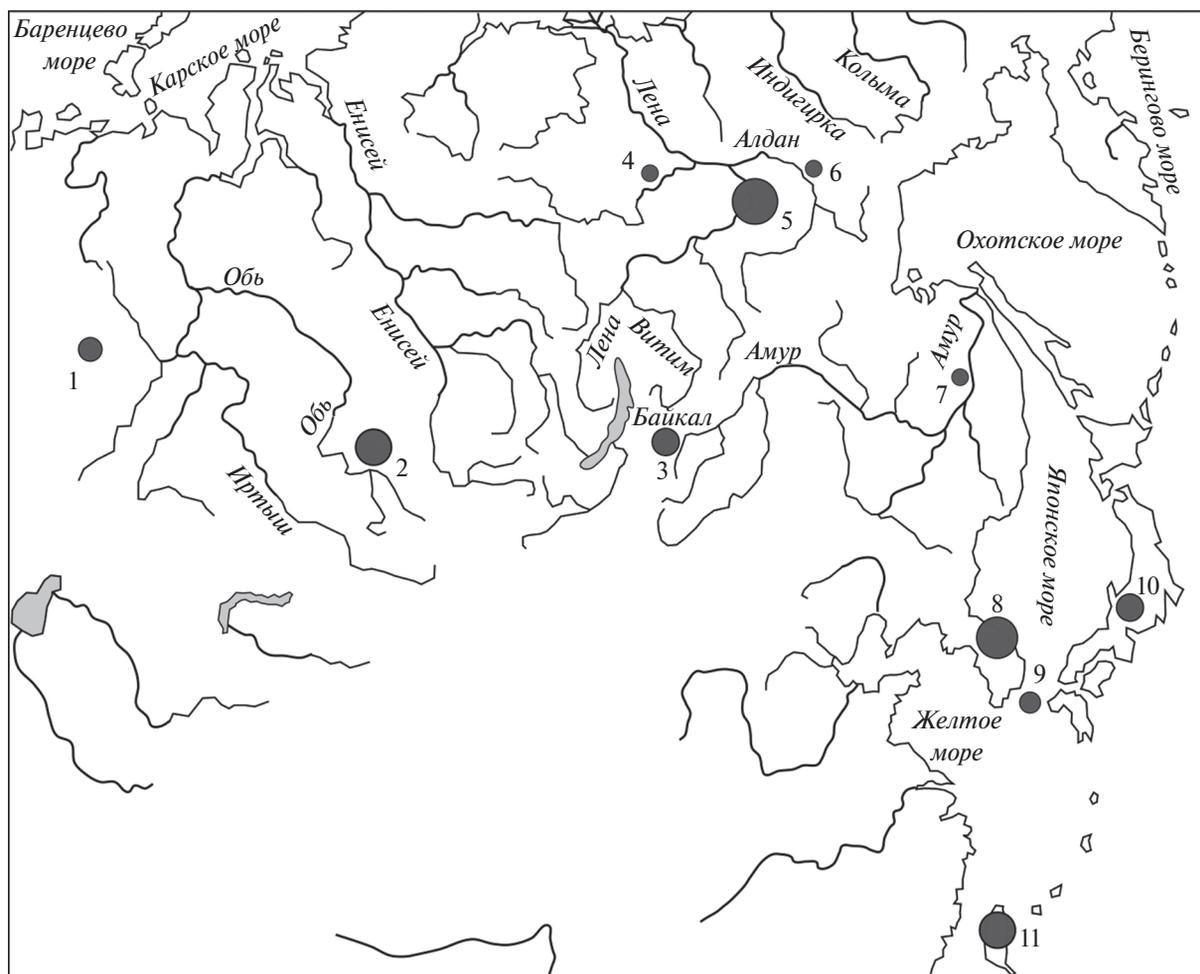
| Возрастная группа | Показатель | Масса тела, г | Длина тела, мм | Длина стопы, мм | Длина хвоста, мм |
|-------------------|------------|---------------|----------------|-----------------|------------------|
| Молодые самки     | $M \pm t$  | 245.4 ± 8.7   | 298.7 ± 2.9    | 50.6 ± 0.3      | 153.3 ± 1.9      |
|                   | <i>n</i>   | 24            | 27             | 22              | 26               |
| Молодые самцы     | $M \pm t$  | 399.8 ± 24.8  | 340.9 ± 7.0    | 60.7 ± 1.4      | 187.9 ± 13.1     |
|                   | <i>n</i>   | 18            | 18             | 11              | 17               |
| Взрослые самки    | $M \pm t$  | 254.6 ± 9.6   | 305.3 ± 2.7    | 48.8 ± 1.1      | 157.6 ± 2.0      |
|                   | <i>n</i>   | 9             | 9              | 6               | 9                |
| Взрослые самцы    | $M \pm t$  | 556.0 ± 30.0  | 364.1 ± 4.1    | 62.0 ± 0.7      | 182.3 ± 9.9      |
|                   | <i>n</i>   | 21            | 22             | 17              | 18               |

Примечание. *t* – Ошибка средней.

Таблица 3. Краниологические показатели колонка в Якутии

| Возрастная группа | Показатель | Признак*, мм |            |            |            |            |            |            |            |
|-------------------|------------|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                   |            | 1            | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          |
| Молодые самки     | $M \pm t$  | 54.3 ± 0.2   | 54.4 ± 0.2 | 49.6 ± 0.3 | 25.4 ± 0.2 | 35.2 ± 0.2 | 27.8 ± 0.2 | 11.1 ± 0.5 | 24.0 ± 0.1 |
|                   | <i>n</i>   | 27           | 24         | 27         | 27         | 27         | 26         | 27         | 27         |
| Молодые самцы     | $M \pm t$  | 60.4 ± 0.6   | 60.5 ± 0.7 | 54.8 ± 0.6 | 29.8 ± 0.5 | 38.4 ± 0.4 | 31.7 ± 0.4 | 11.8 ± 0.2 | 27.2 ± 0.4 |
|                   | <i>n</i>   | 24           | 22         | 24         | 24         | 23         | 25         | 24         | 24         |
| Взрослые самки    | $M \pm t$  | 53.9 ± 0.5   | 54.4 ± 0.3 | 49.1 ± 0.5 | 25.1 ± 0.4 | 34.0 ± 0.3 | 28.7 ± 0.6 | 10.9 ± 0.4 | 24.0 ± 0.2 |
|                   | <i>n</i>   | 22           | 20         | 22         | 22         | 22         | 22         | 22         | 22         |
| Взрослые самцы    | $M \pm t$  | 62.7 ± 0.3   | 62.8 ± 0.3 | 57.0 ± 0.3 | 32.0 ± 0.4 | 38.5 ± 0.3 | 34.7 ± 0.3 | 12.5 ± 0.1 | 28.3 ± 0.4 |
|                   | <i>n</i>   | 29           | 25         | 29         | 28         | 29         | 28         | 28         | 29         |

Примечание. \*1 – Кондиллобазальная длина; 2 – общая длина; 3 – основная длина; 4 – длина лицевого отдела; 5 – длина мозгового отдела; 6 – скуловая ширина; 7 – межглазничная ширина; 8 – мастоидная ширина.



**Рис. 1.** Географическое распределение гаплотипов колонка в ареале (1 – Урал; 2 – басс. верхнего течения реки Обь (Алтай); 3 – Забайкалье; 4 – басс. нижнего течения реки Вилюй (Якутия); 5 – басс. средней Лены (Якутия); 6 – басс. нижнего течения реки Алдан (Якутия); 7 – басс. реки Амур (Приморье); 8 – П-ов Корея; 9 – Архипелаг Цусима; 10 – Остров Хонсю (Япония); 11 – Остров Тайвань). Величина кружков пропорциональна размеру выборки.

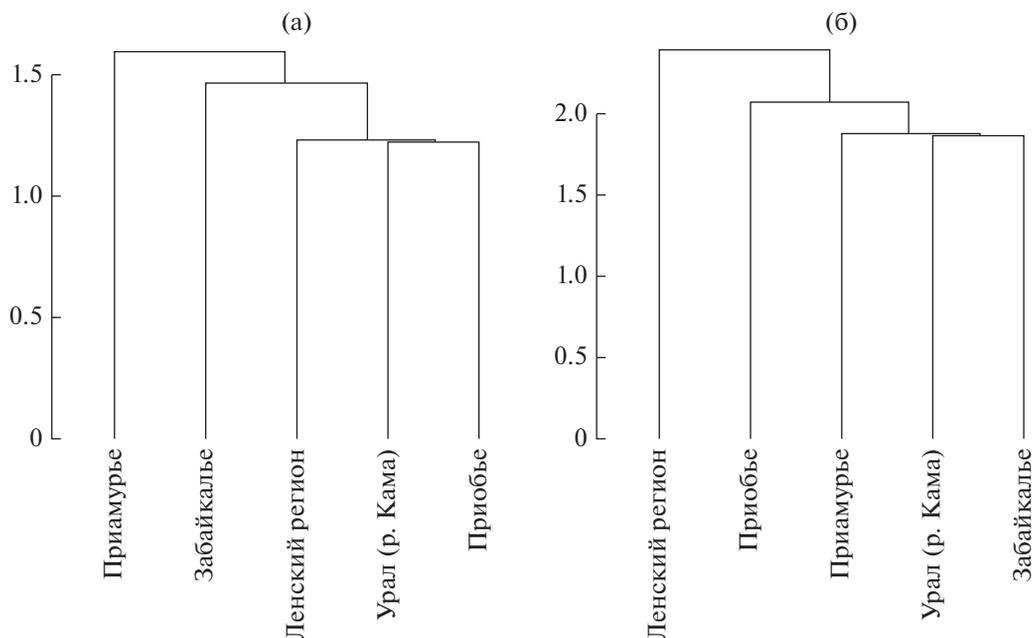
ские, обские (западносибирские) и одна особь из бассейна р. Кама образовали хорошо дифференцированный кластер. Среди самцов основание дендрограммы образуют среднеленские и обские колонки, а отдельный кластер – амурские и забайкальские. Таким образом, межпопуляционное сравнение размеров черепа колонка по средним показателям и их кластерный анализ, дают сходные результаты. В обоих случаях среднеленские колонки обнаруживают большое морфологическое сходство с западносибирскими, а забайкальские с амурскими зверьками.

Изменчивость митохондриальной ДНК в разных частях ареала колонка относительно высокая (табл. 4). Якутский (среднеленский) колонки на этом фоне отличается относительно большим гаплотипическим разнообразием и пониженным уровнем нуклеотидного разнообразия. В целом на территории России показатели генетической

изменчивости несколько ниже, чем в Кореи и Японии.

На медианной сети гаплотипов колонка выделены три гаплогруппы, характеризующие филогенетические взаимоотношения между географическими популяциями вида (рис. 3).

В первую группу (I) вошли в основном гаплотипы колонка Алтая, Урала, Якутии, Забайкалья и одного образца из Приморья. Во вторую гаплогруппу (II) вошли главным образом колонки п-ова Корея, архипелага Цусима, а также одна особь из Приморья. В пределах этой группы обособлены колонки с гаплотипами H\_10, H\_11 и H\_12. Третью четко обособленную группу (III) образовали колонки с о-вов Тайвань и Хонсю. Наиболее удален в ней гаплотип H\_14 (о-в Хонсю, Япония), связанный со второй и третьей гаплогруппами посредством 7 мутационных шагов и необнаруженного или вымершего гаплотипа.



**Рис. 2.** Географическая дифференциация колонка по краниометрическим признакам (а – самки, б – самцы) методом минимальной дисперсии Уорда.

Максимальные значения показателя межпопуляционной подразделенности  $F_{ST}$  получены при попарном сравнении географически наиболее удаленных континентальных популяций с популяцией Японского архипелага (табл. 5). В других вариантах попарного сравнения выборок значения  $F_{ST}$  были довольно низкими (от 0.131 до 0.670; в среднем, 0.411).

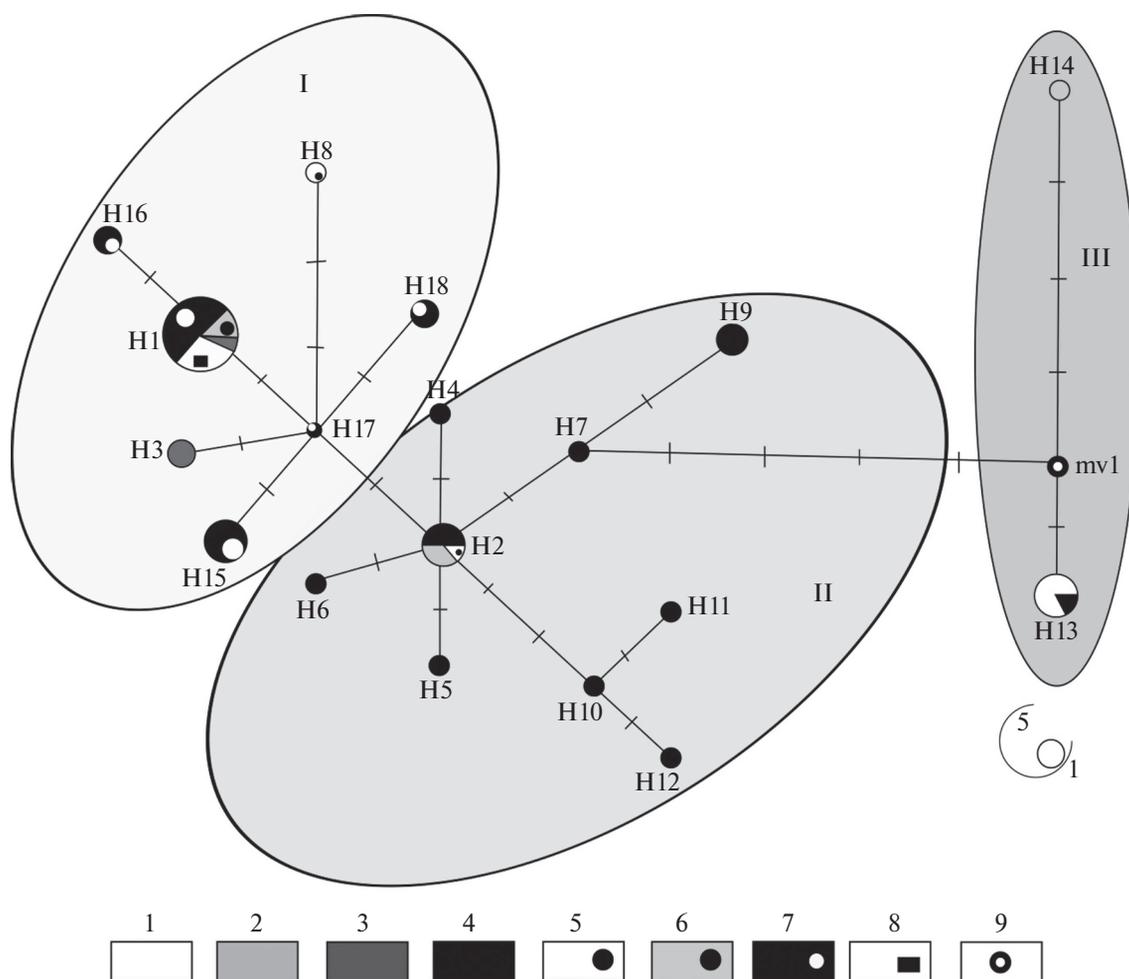
Тест на нейтральность эволюции Tajima’s в рассматриваемых популяциях дал отрицательные

и недостоверные значения, как для отдельных выборок, так и для всей гаплогруппы (табл. 6). Отрицательная и на грани достоверности величина отмечена только для выборки с Японского архипелага. Показатели теста Fu’s  $F_s$  также в основном отрицательны и в большинстве случаев статистически незначимы. Отрицательное достоверное значение отмечено для объединенной выборки забайкальских и приморских колонков, а также для всей исследованной выборки. Величина  $F_u$

**Таблица 4.** Полиморфизм последовательностей фрагмента ген *cut b* мтДНК в разных частях ареала колонка

| №  | Район                                    | <i>n</i> | <i>S</i> | <i>h</i> | $H_d$ | $\pi$   | <i>k</i> |
|----|--|----------|----------|----------|-------|---------|----------|
| 1  | Забайкалье                               | 3        | 2        | 2        | 0.667 | 0.00287 | 1.333    |
| 2  | Урал (Челябинская, Свердловская области) | 2        | 0        | 1        | –     | –       | –        |
| 3  | Япония (Архипелаг Цусима и о-в Хонсю)    | 5        | 8        | 2        | 0.400 | 0.00690 | 3.200    |
| 4  | Приморье (бассейн Амура)                 | 2        | 3        | 2        | 1.000 | 0.00647 | 3.000    |
| 5  | Полуостров Корея                         | 13       | 14       | 10       | 0.949 | 0.00658 | 3.051    |
| 6  | Остров Тайвань                           | 5        | 0        | 1        | –     | –       | –        |
| 7  | Якутия (басс. средней Лены)              | 22       | 4        | 5        | 0.714 | 0.00292 | 1.355    |
| 8  | Западная Сибирь (Алтай, р. Бия)          | 7        | 0        | 1        | –     | –       | –        |
| 9  | Общая выборка колонка                    | 59       | 23       | 18       | 0.856 | 0.00712 | 3.303    |
| 10 | Россия                                   | 36       | 8        | 8        | 0.672 | 0.00290 | 1.346    |
| 11 | Корея, Япония                            | 23       | 16       | 11       | 0.854 | 0.00862 | 4.000    |

Примечание. *n* – число образцов, *S* – число полиморфных (сегрегирующих сайтов), *h* – число гаплотипов,  $H_d$  – гаплотипическое разнообразие,  $\pi$  – нуклеотидное разнообразие, *k* – среднее число нуклеотидных различий (на сайт).



**Рис. 3.** Медианые сети гаплотипов колонков: 1 – О-в Тайвань (белый); 2 – Архипелаг Цусима и о-в Хонсю (серый); 3 – Забайкалье (темно-серый); 4 – П-ов Корея (черный); 5 – Приморье (бассейн Амура) (белый с черным кругом); 6 – Урала (Челябинская, Свердловская области) (серый с черным кругом); 7 – Якутии (Лено-Алданское и Лено-Вилюйское междуречья) (черный с белым кругом); 8 – Алтай (басс. р. Бия) (белый с черным прямоугольником); 9 – Черная окружность обозначает необнаруженные или вымершие гаплотипы. Цифры на связях отражают число замен между гаплотипами. Размер кругов (от 1 до 5) соответствует количеству особей, представляющих данный гаплотип.

для гаплотипов колонка с Японских островов имеет положительное значение.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

**Морфология.** Колонки характеризуется хорошо выраженным половым диморфизмом массы и

размеров тела и черепа. Наибольшие половые различия у взрослых колонков выявлены по массе тела, которые у самцов были вдвое больше, чем у самок. Это согласуется с литературными данными по разнице массы тела у самцов и самок разных видов куницеобразных, включая колонка, варьирующей в пределах от 1.4 у куницы и солонгоя до

**Таблица 5.** Попарные значения  $F_{ST}$  исследованных выборок колонка

| № | Район отбора проб               | 1            | 2            | 3     | 4     | 5 |
|---|---------------------------------|--------------|--------------|-------|-------|---|
| 1 | Забайкалье и Приморье           | 0            |              |       |       |   |
| 2 | Западная Сибирь (Алтай, р. Бия) | 0.388        | 0            |       |       |   |
| 3 | Япония (о-ва Цусима, Хонсю)     | 0.421        | 0.670        | 0     |       |   |
| 4 | Полуостров Корея                | 0.334        | <b>0.587</b> | 0.257 | 0     |   |
| 5 | Якутия (средняя Лена)           | <b>0.131</b> | 0.351        | 0.557 | 0.410 | 0 |

**Таблица 6.** Тест на нейтральность популяций колонка

| Районы отбора проб                | <i>n</i> | Tajima's <i>D</i> ( <i>p</i> ) | Fu's <i>F<sub>s</sub></i> ( <i>p</i> ) |
|-----------------------------------|----------|--------------------------------|--|
| 1. Забайкалье и Приморье          | 5        | −0.561 (0.399)                 | −5.572 (0.024)                         |
| 2. Западная Сибирь (Алтай, р.Бия) | 7        | —                              | —                                      |
| 3. Япония (о-ва Цусима, Хонсю)    | 5        | −1.192 (0.095)                 | 3.679 (0.971)                          |
| 4. Полуостров Корея               | 18       | 0.152 (0.608)                  | −1.850 (0.169)                         |
| 5. Якутия (средняя Лена)          | 22       | 0.659 (0.781)                  | −0.211 (0.438)                         |
| Для всей выборки                  | 59       | −1.052 (0.146)                 | −5.572 (0.030)                         |
| Россия                            | 36       | −0.881 (−0.881)                | −2.381 (0.08)                          |
| Корея и Япония                    | 23       | −0.2779 (0.432)                | −2.007 (0.169)                         |

3.1 раз у итатси (Терновский, Терновская, 1994). Возрастная динамика массы и величины тела и черепа у молодых самцов колонка занимает более продолжительный период, чем у самок; они позже достигают веса и размеров взрослых животных.

По данным В.А. Тавровского и др. (1971), полученным в середине прошлого столетия, средние показатели массы и длины тела взрослых самцов ( $353 \pm 10.4$  г и  $332 \pm 3.0$  мм) и самок ( $203 \pm 7.0$  г и  $277 \pm 4.0$  мм) якутского колонка значительно меньше ( $p < 0.01$ ), чем в нашей выборке (см. табл. 2). Как мы полагаем, это связано с использованием разных методов определения возраста и разным возрастным составом исследованных зверьков, а не с реальным увеличением их размеров. Такие же различия выявляются по кондилобазальной длине, скуловой и мастоидной ширине черепа у самцов ( $p < 0.01$ ), у самок эти показатели сходны, кроме мастоидной ширины ( $p < 0.01$ ). Сравнение наших выборок черепов взрослых колонков (1–3+ года) за 1950–1980 гг. и 2000-е гг. не выявило хронологической изменчивости, их размерные характеристики соответствовали таковым *M. s. sibirica*.

**Изменчивость митохондриальной ДНК.** По уровням гаплотипического и нуклеотидного разнообразия среднененская популяция колонка близка к сибирским популяциям вида. Изначально низкая эффективная численность и пониженный биотический потенциал подобных группировок при накоплении генетической изменчивости могут значительно повышаться, обеспечивая популяционный рост (Avice, 2000). В Приморье, Японии и на Корейском п-ове колонок характеризуется генетическими параметрами предковых популяций.

**Филогения.** Медианная сеть гаплотипов колонка на значительной части Северной Азии четко разделена на гаплогруппы. Континентальные популяции образуют две группы, соответствующие подвиговому разделению на дальневосточную (*M. s. manchurica* Pall., 1911) и сибирскую формы (*M. s. sibirica* Pall., 1773) (Аристов, Барышников, 2001). В группу *manchurica* вошли преимущественно гаплотипы

колонка из Приморья и п-ова Корея, в группу *sibirica* — из бассейнов р. Лены и р. Оби.

Предполагается, что расселение колонка из коренного ареала на юго-востоке Азии и Приморья происходило в постледниковый период и продвинулось до западных пределов в первой половине XIX в. (Кассал, 2013). Это подтверждается отсутствием плейстоценовых находок колонка в северной части современного ареала, а также низкими и в большинстве своем недостоверными значениями Tajima's *D* и Fu's *F<sub>s</sub>* в сибирских популяциях (Ishikawa и др., 2020; наши данные).

На юге Дальнего Востока ископаемые останки колонка известны с позднего плейстоцена (Алексеева, Барышников, 2020). В Средней Сибири, на севере Приангарья они датируются ранним голоценом (8–10.3 тыс. л. н.) (Клементьев, 2014). В бассейн средней Лены он проник, в среднем, голоцене во время климатического оптимума и окончательного формирования современной растительности (6–5 тыс. л. н.) (Боескоров, Барышников, 2013). Однако остаются неизвестными границы распространения и численность колонка в этом регионе. В документах о ясачных сборах в Якутии в XVII в. упоминаются все массовые пушные виды — соболь, лисица, песец, горностай, белка, однако сведения о колонке отсутствуют. Не упоминается мех колонка в описаниях одежды народов Якутии в XVII–XVIII в. (Гаврильева, 2000; Миллер, 2009). Сообщения о заготовках колонка появляются только в начале XIX в., причем сразу о больших их объемах. В 1837–1843 гг. из Якутии ежегодно вывозилось от 1050 до 5000 шкурок этого вида (Некоторые замечания о Якутской ярмарке, 1817; Павлов, 1972; Дьяконов, 1990). Изложенное может объясняться двумя причинами: поздним вовлечением в пушной рынок шкурок колонка вследствие снижения численности и добычи более популярных пушных видов; подъемом численности колонка и повышением эффективности его промысла. Одним из факторов этого роста численности могло быть снижение угнетающего пресса со стороны соболя, истребленного

к тому времени на больших территориях. Их обостренные межвидовые отношения и агрессивность соболя по отношению к колонку наблюдались во многих частях ареала (Тимофеев, Надев, 1955; Войлочников, 1977; и др.).

Идентичность морфо-генетических признаков якутского колонка с сибирскими популяциями, а также сравнительно позднее появление в Якутии свидетельствуют о сложной истории освоения им данного региона. Из этих и палеонтологических данных (см. выше) можно предположить, что первоначально расселение колонка из исходного ареала шло в западном направлении – в Среднюю и Западную Сибирь. Заселение колонком холодных районов Якутии было вторичным явлением в этом процессе, возникшим по мере адаптации и формирования новых популяций в Сибири, а затем расширения их ареала на северо-восток.

**Финансирование.** Исследования выполнены в рамках проектной части государственного задания в сфере научной деятельности Министерства науки и высшего образования РФ по теме FSRG-2020-0019 “Био- и хеморазнообразие экосистем, эволюция и генетические особенности биоиндикаторов Восточной Сибири и разработка технологий освоения возобновляемых растительных ресурсов”, 2020–2022 гг. и “Структура и динамика популяций и сообществ животных холодного региона Северо-Востока России в современных условиях глобального изменения климата и антропогенной трансформации северных экосистем: факторы, механизмы, адаптации, сохранение” (номер гос. регистрации АААА-А17-117020110058-4)

**Соблюдение этики работы с животными.** Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алексеева Э.В., Барышников Г.Ф.* Позднеплейстоценовые и голоценовые остатки хищных млекопитающих (Carnivora) из пещеры Блинец на юге Дальнего Востока России // Тр. Зоологического института РАН. 2020. Т. 324. № 3. С. 388–444.
- Аристов А.А., Барышников Г.Ф.* Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Хищные и ластоногие. СПб., 2001. 560 с.
- Боевсков Г.Г., Барышников Г.Ф.* Позднечетвертичные хищные млекопитающие Якутии. М.: Наука, 2013. 210 с.
- Бромлей Г.Ф., Костенко В.А., Николаев И.Г., Охотина М.В., Юдин В.Г., Братенков П.В.* Млекопитающие Зейского заповедника. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1984. 142 с.
- Войлочников А.Т.* Колонок. Общие сведения. Предбайкалье и Забайкалье. Дальний Восток // Колонок, горностай, выдра. М.: Наука, 1977. С. 5–70.
- Гаврильева Р.С.* Одежда народа Саха конца XVII–середины XVIII века: опыт этнографической реконструкции // Дисс. на соиск. уч. степ. канд. ист. наук. Якутск, 2000. 221 с.
- Гентнер В.Г., Наумов Н.П., Юргенсон П.Б., Слудский А.А., Чиркова А.Ф., Банников А.Г.* Млекопитающие Советского Союза. Т. 2. Часть 1. Морские коровы и хищные. М.: Высшая школа, 1967. 1004 с.
- Дьяконов А.Л.* Пушной промысел в Якутии конца XVIII–середины XIX века. Якутск: ЯНЦ СО АН СССР, 1990. 144 с.
- Кассал Б.Ю.* Колонок *Mustela sibirica* в среднем Прииртыше // Рос. Журн. Биол. Инвазий 2013. №3. С. 38–59.
- Клевезаль Г.А.* Принципы и методы определения возраста млекопитающих. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2007. 288 с.
- Клементьев А.М.* Раннеголоценовая фауна северной Ангары (материалы археологических объектов) // Известия Иркутского Гос. Университета. Сер. Геоархеология. Этнология. Антропология. 2014. Т. 8. С. 31–44.
- Миллер Г.Ф.* Описание сибирских народов / Изд. А.Х. Элерт, В. Хинтцше / Пер. с нем. А.Х. Элерт. М.: Памятники исторической мысли, 2009. 456 с. (Источники по истории Сибири и Аляски из российских архивов: VIII, 1; Герард Фридрих Миллер. Этнографические труды. Часть 1.
- Некоторые замечания о Якутской ярмарке // Казанские известия. 1817. № 103. С. 473–474.
- Новиков Г.А.* Хищные млекопитающие фауны СССР. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1956. 294 с.
- Павлинов И.Я., Россолимо О.Л.* Половые различия в развитии, размерах и пропорциях черепа лесной куницы *Martes martes* L. (MAMMALIA, MUSTELIDAE) // Бюллетень МОИП, отд. Биологии, 1974. Т. 79(6). С. 23–35.
- Павлов П.Н.* Пушной промысел в Сибири XVII в. Красноярск, 1972. 408 с.
- Строганов С.У.* Звери Сибири. Хищные. М: Изд-во АН СССР, 1962. 458 с.
- Тавровский В.А., Егоров О.В., Кривошеев В.Г.* и др. Млекопитающие Якутии. М.: Наука, 1971. 660 с.
- Терновский Д.В., Терновская Ю.Г.* Экология куницеобразных. Новосибирск: ВО Наука, 1994. 223 с.
- Тимофеев В.В., Надев В.Н.* Соболя. М.: Изд-во техн. и экон. лит-ры по вопросам заготовок, 1955. 404 с.
- Avise J.C.* Phylogeography: The History and Formation of Species. Cambridge, MA: Harvard Univ. Press, 2000.
- Ellerman J.R., Morrison-Scott T.C.S.* Checklist of Palearctic and Indian mammals 1758 to 1946. L.: British Museum, 1951. 810 p.
- Hosoda T., Sato J.J., Lin L.K. Chen Y.J., Harada M., Suzuki H.* 2011. Phylogenetic history of mustelid fauna in Taiwan inferred from mitochondrial genetic loci // Can. J. Zool. Vol. 89: 559–569. 4  
<https://doi.org/10.1139/Z11-029>

- Hosoda T., Suzuki H., Harada M., Tsuchiya K., Han S.H., Zhang Y., Kryukov A.P., Lin L.K. Evolutionary trends of the mitochondrial lineage differentiation in species of genera *Martes* and *Mustela* // *Genes Genet. Syst.* 2000. 75(5): 259–267.
- Ishikawa K., Abramov A.V., Amaike Y., Nishita Y., Masuda R. Phylogeography of the Siberian weasel (*Mustela sibirica*), based on a mitochondrial DNA analysis // *Biological Journal of the Linnean Society.* 2020. V. 129. P. 587–593.  
<https://doi.org/10.1093/biolinnean/blz202>
- Koh H.S., Jang K.H., Oh J.G., Han E., Jo J.E., Ham J.E., Jeong S.K., Lee J.H., Kim K., Kweon G.H., In S.T. Lack of mitochondrial DNA sequence divergence between two subspecies of the Siberian Weasel from Korea: *Mustela sibirica coreanus* from the Korean Peninsula and *M.s. quepartis* from Jeju Island // *Anim. Szst. Evol. Divers.* 2012. V. 28. № 2: P. 133–136.  
<https://doi.org/10.5635/ASED.2012.28.2.133>
- Kurose N., Abramov A.V., Masuda, R. Intrageneric diversity of the cytochrome B gene and phylogeny of eurasian species of the genus *mustela* (mustelidae, carnivora) // *Zool. Sci.* 2000. 17 (5): 673–679.  
<https://doi.org/10.2108/zsj.17.673>
- Shalabi M., Abramov A.V., Kosintsev P.A., Lin L-K, Han S.H., Watanabe S., Yamazaki K., Kaneko Y., Masuda R. Comparative phylogeography of the endemic Japanese weasel (*Mustela itatsi*) and the continental Siberian weasel (*Mustela sibirica*), revealed by complete mitochondrial genome sequences // *Biol. J. the Linnean Society.* 2016. 120: 333–348.  
<https://doi.org/10.1111/bij.12891>
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989. P. 1–421.
- Librado P., Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // *Bioinformatics* 2009. V. 25. P. 1451–1452.

## Morpho-Genetic Features of the Siberian Weasel (*Mustela sibirica* Pall.) on the North-Eastern Edge of the Area (Middle Lena Basin, Yakutia)

E. S. Zakharov<sup>1, 2, #</sup>, V. M. Safronov<sup>1</sup>, N. N. Zakharova<sup>2</sup>, L. A. Pestryakova<sup>2</sup>, L. P. Koryakina<sup>3</sup>, S. Kruse<sup>4</sup>, and N. A. Bochkarev<sup>5</sup>

<sup>1</sup> *Institute for Biological Problems of the Cryolithozone, Russian Academy of Sciences, Yakutsk, 41 Lenin avenue, 677980 Russia*

<sup>2</sup> *Institute of Natural Sciences, North-Eastern Federal University in Yakutsk, Belinskogo str. 58, 677000 Yakutsk, Russia*

<sup>3</sup> *Arctic State Agrotechnological University, Yakutsk, Sergelyakhskoe rd. 3, 677007 Russia*

<sup>4</sup> *Alfred Wegener Institute Helmholtz Centre for Polar and Marine Research, Telegrafenberg A45, 14473 Potsdam, Germany*

<sup>5</sup> *Institute of Animal Systematics and Ecology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Frunze str. 11, 630091 Russia*

#e-mail: zevsable@gmail.com

The sex and age differences of the Siberian weasel by morphological characteristics were considered, the value of sexual dimorphism was estimated by the main dimensional characteristics. A high haplotypic diversity and a reduced level of nucleotide diversity of the Siberian weasel in Yakutia were revealed. The similarity of the Yakut and West Siberian Siberian weasels in the complex of morpho-genetic features and their differences from the Far Eastern subspecies, including the variability of the fragment of the cytochrome b mtDNA gene, have been established. A median network of Siberian weasel haplotypes was built, characterizing the phylogenetic relationships between populations. Shows the possible ways and sequence of settlement of the Siberian weasel in North Asia

*Keywords:* Siberian weasel, subspecies, morphology, mtDNA, genetic structure

---

---

**ФИЗИОЛОГИЯ  
ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА**

---

---

УДК 612.115.3-612.115.064

**ВЛИЯНИЕ ХИТОЗАНА НА СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ  
ГЕПАРИНИЗИРОВАННЫХ КРЫС**

© 2022 г. Л. А. Ляпина\*, @, Т. Ю. Оберган\*, М. Е. Григорьева\*, Т. А. Шубина\*

\* ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, лаборатория защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова, Москва, 119234 Россия

@E-mail: lyapinal@mail.ru

Поступила в редакцию 29.09.2021 г.

После доработки 14.01.2022 г.

Принята к публикации 21.03.2022 г.

Хитозан в условиях *in vitro* в гепаринизированной плазме при концентрациях  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , 1, 5, 10 мг/мл дозозависимо снижает фибринолиз, протромбиновое время, агрегацию тромбоцитов, свертываемость крови и повышает активность фактора XIIIa. В организме на модели крыс с гипокоагуляцией, вызванной внутривенным введением высокомолекулярного гепарина (ВМГ) (400 МЕ/кг), через 30 мин после инъекции хитозана (10 мг/кг массы тела) также снижается фибринолиз, активность плазмина, повышается активность фактора XIIIa и агрегация тромбоцитов, а концентрация фибриногена восстанавливается до нормального значения. Это сопровождается повышением активности тканевого активатора плазминогена и удлинением свертываемости крови по тесту АЧТВ. Делается вывод о разнонаправленном влиянии хитозана на параметры гемостаза в данных условиях эксперимента и рассматриваются возможные механизмы его действия в организме.

**Ключевые слова:** хитозан, гепарин, модель гипокоагуляции, фибринолиз, первичный гемостаз, свертываемость крови

**DOI:** 10.31857/S1026347022060099

Полисахарид хитозан (олигосахарид/хитоолигосахарид) является основным продуктом деградации хитина путем химического гидролиза или ферментативной деградации, включающей процессы дезацетилирования и деполимеризации. Хитозан применяется в биомедицине, сельском хозяйстве и фармацевтической промышленности, в том числе в области лекарственных средств, продуктов питания, косметики, биоматериалов и тканевой инженерии (Lestari *et al.*, 2020). По сравнению с другими доступными полисахаридами хитозан обладает низкой молекулярной массой, более высокой степенью дезацетилирования и полимеризации, менее вязкой и полной растворимостью в воде, что наделяет его уникальными биологическими свойствами, такими как антимикробные, антиоксидантные, противоопухолевые, противовоспалительные, антибактериальные, биологическое распознавание и иммунные усиливающие эффекты, антигипертензивные, а также способностью к доставке лекарств/ДНК (Naveed *et al.*, 2019). Кроме того, он проявляет антидиабетическое, анти-ВИЧ-1, анти-болезнь Альцгеймера, гипохолестеринемическое и гемо-

статическое действие. Показано, что хитозан обладает более высокой клеточной трансдукцией и полностью всасывается через кишечный эпителий благодаря своей катионной сфере, экспонируемой на более коротких *N*-глюкозаминовых (*N*-Glc) единицах (Guo *et al.*, 2018). Хитозан, введенный *in vivo*, будет контактировать с тканью крови или проникать в нее. В этой ситуации взаимодействие хитозана с компонентами крови имеет решающее значение для определения эффективности и безопасности полимера, поскольку была установлена токсичность его высоких доз (Yang *et al.*, 2012). Было показано, что хитозан и фибриноген могут образовывать комплекс главным образом за счет электростатического притяжения, в результате чего структура и конформация фибриногена изменяются (Zhang *et al.*, 2013). Кроме того, хитозан с мол. массой 4 kDa и степенью деполимеризации 85% взаимодействует и с низкомолекулярным гепарином (Толстенков и др., 2006). Хитозан имеет высокие профили абсорбции на кишечном уровне, что позволяет быстро получить доступ к кровотоку и потенциальному контакту с компонентами крови (Zhang *et al.*, 2013).

При действии на эритроциты хитозан не вызывает гемолиза, а при высокой концентрации эритроцитов наблюдается их необратимая агрегация. Имеются сообщения, что по отношению к системе свертывания крови хитозан обладает умеренной антикоагулянтной активностью, не активирует тромбоциты и подавляет агрегацию тромбоцитов (Guo *et al.*, 2018). Отмечают, что хитозан мало влияет на такие параметры свертывания крови как активированное частичное тромбопластиновое время, протромбиновое время (Cassano *et al.*, 2017).

Известно, что сульфатированные хитозаны со степенью замещения 2.13 и мол. массами 71, 35 и 19 кДа обнаруживают антикоагулянтную активность, ускоряя ингибирование тромбина путем создания эквимольного комплекса с антитромбином III. Установлено также, что при совместном внутривенном введении в равных весовых соотношениях гепарина и сульфата хитозана антитромботическая активность гепарина усиливается (Дрозд, Макаров, 2013). Однако влияние хитозана на компоненты крови при сниженной ее свертываемости до сих пор остается неясным.

Цель настоящей работы заключается в выявлении влияния хитозана на свертывание крови в условиях моделирования у крыс гипокоагуляции, вызванной внутривенным введением высокомолекулярного гепарина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали хитозан водорастворимый (сукцинил хитозана), полученный по запатентованной методике из панцирей красноногих крабов в соответствии с ТУ 9284-027-11734126-08 (ООО “Биопрогресс”, Россия). В экспериментах применяли хитозан с мол. массой 150 кДа, степенью дезацетилирования 75.4%, рН 1%-го водного раствора – 7.6 и динамической вязкостью 2150 мПа; динатриевую соль аденозина дифосфата – АДФ (“AppliChem”, Германия); цитрат натрия (“Технология-Стандарт”, Россия), натрия хлорид 0.85%-ный раствор (“Гротекс”, Россия), гепарин высокомолекулярный (ВМГ) (“Richter”, Венгрия).

Эксперименты проводили на лабораторных белых крысах-самцах линии Wistar массой тела 450–500 г. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и документами, рекомендованными Европейским научным фондом и Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным.

В серии экспериментов в условиях *in vitro* использовали модель гипокоагуляции. Для этого получали гепаринизированную плазму крови крыс, которым предварительно вводили ВМГ внутривенным способом в дозе 400 МЕ/кг для создания гипокоагуляционного эффекта, через 30 мин после инъекции гепарина производили забор крови. Затем к 0.1 мл пулированной плазмы крови животных добавляли 0.05 мл раствора хитозана (ХТЗ) в различных концентрациях –  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , 1, 5 и 10 мг/мл, инкубировали в течение 2 мин при 37°C и проводили коагулологические определения согласно методикам.

Эксперименты *in vivo* проведены на модели гипокоагуляции, вызванной внутривенным введением животным раствора ВМГ в дозе 400 МЕ/кг массы тела в объеме 0.5 мл каждой крысе, через 30 мин после этого инъецировали раствор ХТЗ в дозе 10 мг/кг массы тела крыс в объеме 0.5 мл. Подопытные животные были разделены на 3 группы по 10 крыс: контрольная группа (ВМГ + 0.85%-ый NaCl), опытная группа (ВМГ + ХТЗ) и интактные (норма). Взятие крови осуществляли через яремную вену (*vena jugularis*) спустя 30 мин после введения ХТЗ (опыт) или 0.85%-ного физиологического раствора NaCl (контроль) с использованием в качестве консерванта 3.8%-го раствора цитрата натрия в соотношении 9 : 1.

Образцы крови центрифугировали на центрифуге ТГ-6 Centrifuge (“Beckman”, США) в двух режимах: при 1000 g в течение 5 мин для получения богатой тромбоцитами плазмы и при 2000 g для получения бедной тромбоцитами плазмы.

Фибринолитическую активность – суммарный (СФА), неферментативный (НФ) и ферментативный фибринолиз (ФФ), активность плазмина, активность тканевого активатора пламиногена (t-РА) и время лизиса эуглобулинового сгустка в бедной тромбоцитами плазме крови определяли согласно описанным методам (Ляпина и др., 2012).

Агрегацию тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме крови исследовали на агрегометре АЛАТ2 ЛА 220 (“Биола”, Россия) по методу Борна с использованием в качестве индуктора агрегации АДФ в конечной концентрации  $10^{-6}$  М по инструкции к прибору.

Для оценки процесса свертывания крови определяли активность фибринстабилизирующего фактора свертывания (ФХП), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), характеризующее внутренний механизм свертывания крови, протромбиновое время (ПВ), характеризующее внешний механизм свертывания крови и

**Таблица 1.** Влияние разных концентраций хитозана на параметры гемостаза при использовании плазмы крыс с гипокоагуляцией, вызванной ВМГ, в условиях *in vitro* ( $M \pm m$ )

| Показатели гемостаза, % | Добавление к плазме 0.85%-го NaCl | Добавление к плазме разных концентраций хитозана (мг/мл) |                  |                |                |               |
|-------------------------|-----------------------------------|--|------------------|----------------|----------------|---------------|
|                         |                                   | 10 <sup>-1</sup>   | 10 <sup>-2</sup> | 1              | 5              | 10            |
| СФА                     | 100 ± 3.7                         | 82.0 ± 4.3*  | 79.7 ± 2.8**     | 73.1 ± 4.3**   | 69.4 ± 4.1**   | 68.3 ± 1.9**  |
| НФ                      | 100 ± 2.5                         | 87.8 ± 2.9*  | 68.0 ± 3.7**     | 57.7 ± 5.0**   | 59.8 ± 1.4**   | 55.3 ± 3.7**  |
| ФФ                      | 100 ± 1.5                         | 96.6 ± 3.6   | 96.5 ± 8.8       | 87.0 ± 8.6*    | 80.1 ± 8.1*    | 77.0 ± 8.8*   |
| ПВ                      | 100 ± 1.0                         | 102.0 ± 1.1  | 89.0 ± 8.4*      | 78.2 ± 3.5**   | 71.2 ± 3.6**   | 72.0 ± 3.3**  |
| ТВ                      | 100 ± 5.4                         | —  | 302.0 ± 21.0**   | 254.0 ± 13.0** | 307.0 ± 16.2** | 131.0 ± 14.2* |
| АЧТВ                    | 100 ± 3.2                         | 115.0 ± 7.3  | 128.5 ± 8.0*     | 170.0 ± *0**   | 142.0 ± 7.8**  | 118.0 ± 7.2   |
| Агрегация тромбоцитов   | 100 ± 4.5                         | 100.0 ± 3.7  | 51.0 ± 5.0**     | 67.0 ± 7.5**   | 73.5 ± 7.7**   | 69.0 ± 5.5**  |
| ФХIIa                   | 100 ± 4.5                         | 105.0 ± 4.0  | 140.0 ± 5.0**    | 144.0 ± 5.2**  | 156.0 ± 5.5**  | 175.0 ± 6.0** |

Примечание. Статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля с NaCl, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

тромбиновое время (ТВ), свидетельствующее об общем процессе свертывания крови по методам, описанным ранее (Баркаган, Момот, 2008; Ляпина и др., 2012).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программного пакета STATISTICA 8.0. При проверке вариационных рядов на нормальность распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  ошибка среднего ( $M \pm SEM$ ). Для межгруппового сравнения трех независимых выборок был применен непараметрический критерий Крускала–Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах *in vitro* при использовании модели гипокоагуляции, имитирующей состояние системы гемостаза с ослабленным свертыванием, было установлено, что добавление ХТЗ к гепаринизированной плазме крови крыс способствовало снижению суммарного и неферментативного фибринолиза, причем эффекты усиливались при увеличении концентрации ХТЗ в системе. Ферментативный фибринолиз изменялся под влиянием ХТЗ слабо и только при высоких его концентрациях в системе (табл. 1).

Исследование свертывания крови показало активирующее действие ХТЗ на факторы внешнего механизма свертывания крови, о чем свидетельствовало укорочение времени образования сгустка по тесту ПВ. В то же время по тестам АЧТВ и ТВ наблюдалось усиление процессов гипокоагуляции, которые ослабевали с увеличением

концентрации ХТЗ. При этом отмечалось подавление АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. Однако в данных условиях эксперимента активности фибринстабилизирующего фактора свертывания ХIIa повышалась в прямой пропорциональной зависимости от используемых концентраций в системе — чем они выше, тем больший эффект обнаруживался (табл. 1).

В экспериментах *in vivo* на животных с гипокоагуляцией, вызванной введением ВМГ, выявлены следующие эффекты ХТЗ: подавлялись все виды фибринолиза плазмы крови (СФА, НФ, ФФ) на 41, 46 и 32% соответственно, укорачивалось время лизиса эуглобулинового сгустка (ВЛЭС) на 19%, снижалась активность плазмина на 29% при повышении активности t-РА на 37% по сравнению с контролем. Это сопровождалось усилением активности свертывающего фактора ХIIa (на 25%), агрегации тромбоцитов (на 28%) и уменьшением концентрации фибриногена (на 23%) по сравнению с контрольной группой. При этом исследованные показатели приближались или достигали значений группы интактных крыс (норма). Однако удлинение АЧТВ на 41% по сравнению с контролем, характеризующее внутренний механизм свертывания, указывало на снижение активности факторов протромбинового комплекса при действии ХТЗ на фоне гипокоагуляции (табл. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализируя полученные в настоящей работе результаты, необходимо отметить, что хитозан как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* оказывал влияние на гемостаз: однозначно подавлял фибринолитическую активность, факторы внешнего пути

**Таблица 2.** Показатели параметров гемостаза на фоне гипокоагуляции, вызванной введением гепарина, через 30 мин после введения хитозана в дозе 10 мг/кг массы тела (опыт), физиологического раствора (контроль) и в группе норма ( $M \pm m$ )

| Показатели гемостаза                     | Группы животных                   |                     |                      |
|--|-----------------------------------|---------------------|----------------------|
|  | контроль<br>(ВМГ + 0.85%-ый NaCl) | опыт<br>(ВМГ + ХТЗ) | норма                |
| СФА, мм <sup>2</sup> (%)                 | 71.4 ± 3.5 (100%)                 | 42.3 ± 1.7 (59%)**  | 38.6 ± 0.5 (54%)**   |
| НФ, мм <sup>2</sup> (%)                  | 45.0 ± 1.1 (100%)                 | 24.1 ± 0.5 (54%)**  | 25.0 ± 0.5 (56%)**   |
| ФФ, мм <sup>2</sup> (%)                  | 26.8 ± 1.1 (100%)                 | 18.1 ± 0.7 (68%)**  | 13.6 ± 0.8 (51%)**   |
| ВЛЭС, мин (%)                            | 120.0 ± 9.3 (100%)                | 97.5 ± 6.1 (81%)**  | 73.3 ± 2.9 (61%)**   |
| Активность t-РА, мм <sup>2</sup> (%)     | 40.8 ± 7.7 (100%)                 | 56.0 ± 6.8 (137%)** | 83.0 ± 4.4 (203%)**  |
| Активность плазмينا, мм <sup>2</sup> (%) | 1.4 ± 0.5 (100%)                  | 1.0 ± 0.01 (71%)**  | 3.7 ± 0.5 (264%)**   |
| АЧТВ, с (%)                              | 49.4 ± 2.9 (100%)                 | 69.8 ± 2.6 (141%)** | 39.9 ± 1.6 (81%)*    |
| Агрегация тромбоцитов (%)                | 2.3 ± 0.2 (100%)                  | 2.95 ± 0.3 (128%)*  | 3.2 ± 0.3 (139%)*    |
| Концентрация фибриногена, мг %           | 404 ± 0.3 (100%)                  | 310 ± 2.0 (77%)**   | 270 ± 2.0 (67%)**    |
| ФХШа, ед (%)                             | 58.0 ± 3.8 (100%)                 | 72.5 ± 3.2 (125%)** | 83.4 ± 3.42 (144%)** |

Примечание. Статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля (ВМГ + NaCl), Обозначения: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

свертывания, а также повышал активность фибринстабилизирующего фактора в крови крыс при гипокоагуляции, вызванной гепарином.

Добавление к гепаринизированной плазме крови животных в условиях *in vitro* различных концентраций хитозана способствовало снижению всех видов фибринолиза (суммарного, неферментативного и ферментативного), протромбинового времени и усилению активности фибринстабилизирующего фактора свертывания крови XIIIa. Это связано с влиянием хитозана на полимеризацию фибрина и активацию факторов внешнего пути свертывания крови, в том числе и тканевого фактора. Установленные нами факты согласуются с данными других авторов, показавших, что у людей с пониженной свертываемостью крови после введения непрямого антикоагулянта варфарина применение препарата Celox, содержащего хитозан, укорачивало протромбиновое время вследствие повышения активности тканевого фактора (Актор *et al.*, 2014). Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что хитозан активирует факторы внешнего пути свертывания.

В то же время в наших экспериментах было показано, что используемый полисахарид хитозан на фоне присутствующего в плазме крови крыс гепарина не оказывал влияния на факторы внутреннего механизма свертывания крови. Это можно объяснить способностью гепарина образовывать комплексы с этими факторами, что приводило к снижению активности коагуляционных соедине-

ний, обеспечивающих процесс свертывания, а этот факт согласуется с ранее полученными данными (Дрозд, Макаров, 2013; Толстенков и др., 2006). Возможно, это обусловлено и недостаточной концентрацией хитозана, добавленного к гепаринизированной плазме крови крыс, о чем и свидетельствуют полученные нами данные.

В условиях организма на модели гипокоагуляции, вызванной внутривенным введением ВМГ, после инъекции хитозана крысам отмечалось, как и в условиях *in vitro*, подавление всех видов фибринолиза, активности плазмينا, повышение активности фактора XIIIa. Однако, в отличие от результатов, полученных *in vitro*, в плазме крови животных после введения хитозана наблюдалось удлинение времени лизиса эуглобулинового сгустка, свидетельствующее об участии хитозана в процессах гиперкоагуляции. Это можно объяснить повышением свертываемости крови вследствие активации не только плазменного, но, как показали наши исследования, и первичного гемостаза за счет усиления агрегации тромбоцитов, что согласуется с данными других авторов (Chou *et al.*, 2003). Однако мы установили агрегационную способность хитозана только в организме, и это позволяет сделать вывод, что механизм данного явления обусловлен взаимодействием хитозана с рецепторами тромбоцитов – гликопротеинами P<sub>b</sub>/IIIa и образованием фибриногеновых мостиков. Данные факты согласуются с результатами других авторов (Кузник и др., 2010). Кроме того, после перорального

введения хитозана животным наблюдалось восстановление концентрации фибриногена до нормального значения по сравнению с контрольной группой, что указывает на положительную антитромботическую роль хитозана в организме. Одновременно при этом наблюдалось повышение активности тканевого активатора пламиногена и некоторое снижение свертываемости крови по внутреннему пути свертывания вследствие удлинения АЧТВ, что также подтверждает способность хитозана препятствовать процессам тромбообразования даже при активации факторов внешнего механизма свертывания. Таким образом, хитозан, усиливающий процессы свертывания крови (Hu *et al.*, 2018), в организме при гипокоагуляции способствует усилению свертываемости как за счет первичного гемостаза и активации факторов внешнего пути свертывания крови, так и вследствие подавления фибринолиза, что впервые показано в данной работе.

Таким образом, изучение действия хитозана в условиях гипокоагуляции, вызванной гепарином, выявило его разнонаправленное действие на параметры системы гемостаза. В условиях *in vitro*, и *in vivo* хитозан подавляет все виды фибринолиза — суммарный, ферментативный, неферментативный и активность пламина. Полученные данные свидетельствуют об активации под влиянием хитозана первичного гемостаза только в условиях организма, что указывает на участие рецепторного аппарата тромбоцитов в этих процессах. Установлен активирующий механизм действия хитозана на факторы внешнего пути свертывания крови.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке МГУ им. М.В. Ломоносова по госбюджетной фундаментальной теме “Регуляторы свертывающей и противосвертывающей систем в норме и при патологии” (номер цитис 121032300076-3).

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

**Вклад авторов.** Идея работы и планирование эксперимента — Л.А. Ляпина, М.Е. Григорьева; проведение экспериментов — все авторы; обработка данных — все авторы; написание статьи — Л.А. Ляпина, М.Е. Григорьева; редактирование статьи — Т.Ю. Оберган.

**Благодарности.** Выражаем благодарность Г.Ю. Ляпину, способствовавшему проведению работы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия системы гемостаза. М.: Ньюдиамед, 2008. 292 с.
- Дрозд Н.Н., Макаров В.А. Антикоагулянтная активность субстанций, нано- и микроструктур на основе производных хитозана // Хитозан: сб. ст. / ред. К.Г. Скрябин, Михайлов С.Н., Варламов В.П. М.: Центр “Биоинженерия”, 2013. С. 530–563.
- Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. Чита: Экспресс издательство, 2010. 832 с.
- Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови. М.: Адвансед Солюшнз, 2012. 160 с.
- Толстенков С.А., Дрозд Н.Н., Макаров В.А., Банникова Г.Е. Биоспецифичный электрофорез комплексов между низкомолекулярными гепаринами и хитозанами // Матер. 8-ой межд. конф. М.: Изд-во ВНИРО, 2006. С. 253–256.
- Aktor S., Emekli-Alturfan E., Ozer C., Gonul O., Garip H., Yarat A., Goker K. Effects of Ankaferd Blood Stopper and Celox on the tissue factor activities of warfarin-treated rats // Clin. Appl. Thromb. Hemost. 2014. V. 20. № 1. P. 16–21.
- Cassano M., Di Gioia M.L., Mellace S., Picci N., Trombino S. Hemostatic gauze based on chitosan and hydroquinone: preparation, characterization and blood coagulation evaluation // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2017. V. 28. № 12. P. 190.
- Chou T.C., Fu E., Wu C.J., Yeh J.H. Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. V. 302. № 3. P. 480–483.
- Guo X., Sun T., Zhong R., Ma L., You C., Tian M., Li H., Wang C. Effects of chitosan oligosaccharides on human blood components // Front. Pharmacol. 2018. V. 3. № 9. P. 1412.
- Hu Z., Lu S., Cheng Y., Kong S., Li S., Li C., Yang L. Investigation of the effects of molecular parameters on the hemostatic properties of chitosan // Molecules. 2018. V. 23. № 12. P. 3147.
- Lestari W., Yusry W., Haris M.S., Jaswir I., Idrus E. (2020) A glimpse on the function of chitosan as a dental hemostatic agent // Jpn. Dent. Sci. Rev. 2020. V. 56. № 1. P. 147–154.
- Naveed M., Phil L., Sohail M., Hasnat M., Baig M.M.F.A., Ihsan A.U., Shumzaid M., Kakar M.U., Mehmood Khan T., Akabar M.D., Hussain M.I., Zhou Q.G. Chitosan oligosaccharide (COS): an overview // Int. J. Biol. Macromol. 2019. V.15. № 129. P. 827–843.
- Yang Z., Han B., Dawei Fu. D., Liu W. Acute toxicity of high dosage carboxymethyl chitosan and its effect on the blood parameters in rats // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2012. V. 23. № 2. P. 457–462.
- Zhang W., Zhong D., Liu Q., Zhang Y. Effect of chitosan and carboxymethyl chitosan on fibrinogen structure and bloodcoagulation // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 2013. V. 24. № 13. P. 1549–1563.

## Chitosan Effect on Blood Coagulation in Heparinized Rats

L. A. Lyapina<sup>1, #</sup>, T. Yu. Obergan<sup>1</sup>, M. E. Grigorjeva<sup>1</sup>, and T. A. Shubina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Lomonosov Moscow State University, Department of biology, Moscow, 119234 Russia*

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

The chitosan added to heparinized blood plasma under *in vitro* conditions at concentrations of  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ , 1, 5, 10 mg/mL dose-dependent reduced fibrinolysis, prothrombin time, platelet aggregation, blood clotting and increased the activity of factor XIIIa. *In vivo*, in a rat model with hypocoagulation caused by intravenous administration of high-molecular heparin (400 MEd/kg body weight), 30 minutes after injection of chitosan (10 mg/kg body weight), a decrease in fibrinolysis, plasmin activity, increased FXIIIa activity and platelet aggregation was also detected. At the same time, the fibrinogen concentration was restored to the normal levels. This was accompanied by an increase in the activity of the tissue plasminogen activator and an extension of the blood clotting time (APTT test). The conclusion was made about the multidirectional effect of chitosan on the hemostasis parameters under hypocoagulation and the possible mechanisms of chitosan action were considered.

*Keywords:* chitosan, heparin, hypocoagulation model, fibrinolysis, hemostasis, blood clotting

ФИЗИОЛОГИЯ  
ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

УДК 618.396:611.12.:57.084+57.086]

ВЫЯВЛЕНИЕ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В СЕРДЦЕ  
ПРЕЖДЕВРЕМЕННО РОЖДЕННЫХ КРЫС

© 2022 г. В. В. Иванова\*, @, И. В. Мильто\*, \*\*, О. Н. Серебрякова\*, И. В. Суходоло\*

\* ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Московский тракт, 2, Томск, 634050 Россия

\*\* ФГБУН СБН Центр ФМБА России, а/я № 130, Северск-13, 636013 Россия

@E-mail: ivvera92@rambler.ru

Поступила в редакцию 13.07.2021 г.

После доработки 14.03.2022 г.

Принята к публикации 08.06.2022 г.

Изучено влияние преждевременного рождения на экспрессию матриксных металлопротеиназ (ММР2 и ММР9) в стенке левого желудочка сердца крыс в раннем постнатальном периоде онтогенеза (до 21 сут). В эксперименте иммуногистохимически исследованы фрагменты сердца преждевременно рожденных (срок гестации – 21 и 21.5 сут) и доношенных (срок гестации – 22 сут) крыс Вистар на 7 и 21 сут постнатального периода онтогенеза. Преждевременное рождение не оказывает эффекта на паттерн иммуногистохимического окрашивания ММР2 в стенке левого желудочка крыс, тогда как содержание ММР9 снижается на 7 сут и увеличивается на 21 сут постнатального периода онтогенеза, по сравнению с таковой доношенных крыс.

*Ключевые слова:* преждевременное рождение, постнатальное развитие, сердце, матриксные металлопротеиназы, эксперимент

DOI: 10.31857/S1026347022060075

Преждевременное рождение у человека (ранее 37 полных недель беременности) является глобальной проблемой. Ежегодно свыше 15 млн детей рождаются до срока, из них 85% – на 32–36 неделе беременности (Blencowe *et al.*, 2012). Преждевременные роды могут быть вызваны соматической патологией матери, индуцированы ятрогенно или же являются спонтанными (Walani, 2020).

В настоящее время не вызывает сомнения наличие связи преждевременного рождения с измененным фенотипом сердца и повышенным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний во взрослом возрасте (Lewandowski *et al.*, 2020). У преждевременно рожденных детей в возрасте 13 и 25 лет показан меньший размер желудочков (Goss *et al.*, 2020), в возрасте 25 лет продемонстрировано снижение ударного и конечного диастолического объемов обоих желудочков, в сравнении с таковыми у доношенных сверстников (Lapidaire *et al.*, 2021). В возрасте 18–40 лет у детей, рожденных ранее 37 недель беременности, показано снижение миокардиального резерва (Huckstep *et al.*, 2018), а также более значимая связь между систолическим артериальным давлением и массовым индексом левого желудочка, чем у доношенных сверстников (Mohamed *et al.*, 2021). У детей, рожденных ранее 37 недель беременности, в возрасте 30–34 лет продемонстрирован более высокий риск

развития ишемической болезни сердца (Crump *et al.*, 2019). Рождение ранее 32 недель беременности является риском раннего развития гипертонической болезни и сердечной недостаточности (Carr *et al.*, 2017).

Установление начальных структурно-функциональных изменений в сердце преждевременно рожденных детей необходимо для понимания механизма развития у них сердечно-сосудистых заболеваний во взрослом возрасте. Основной массив клинических данных получен с помощью методов функциональной диагностики, таких как МРТ, ЭКГ, УЗИ (Crump *et al.*, 2019; Goss *et al.*, 2020; Lewandowski *et al.*, 2020; Mohamed *et al.*, 2021), и не позволяет детально охарактеризовать гистологические и цитологические особенности миокарда преждевременно рожденных детей. Таким образом, актуальным для изучения влияния преждевременного рождения на строение и функционирование миокарда является проведение экспериментальных исследований.

Ремоделирование межклеточного матрикса играет важную роль в регуляции пролиферации, дифференцировки, миграции и гибели клеток как в норме, так и при патологии (Silva *et al.*, 2021). Преждевременное рождение ассоциировано с развитием окислительного стресса (Falsaperla *et al.*, 2020), одним из эффектов которого является активация

матриксных металлопротеиназ (Siwik, Colucci, 2004). Патогенетическая роль матриксных металлопротеиназ в ремоделировании сердца в результате преждевременного рождения не изучена. Цель данного исследования заключается в установлении влияния преждевременного рождения на экспрессию матриксных металлопротеиназ в сердце крыс в раннем постнатальном периоде онтогенеза.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали крыс Вистар обоего пола, из которых были сформированы 3 группы: контрольная группа (доношенные животные, продолжительность беременности 22 сут, 10 особей), 1 группа (недоношенные крысы, продолжительность беременности 21.5 сут, 10 особей) и 2 группа (недоношенные крысы, продолжительность беременности 21 сут, 10 особей). Для получения потомства, к самкам крыс Вистар (3 мес, 180 ± 20 г) в стадии проэструса полового цикла на ночь подсаживали самцов крыс линии Вистар (2 мес, 180 ± 20 г). Утром следующего дня анализировали влажалищные мазки самок крыс и считали первым днем беременности день обнаружения у самок во влажалищном мазке сперматозоидов. Индукцию преждевременных родов на 21 и 21.5 сут беременности осуществляли подкожным введением крысам мифепристона (1 мл, 10 мг/кг массы тела, “Sigma-Aldrich”, США) на 20 и 20.5 сут беременности соответственно (Dudley *et al.*, 1996). Выведение потомства из эксперимента осуществляли на 7 и 21 сут постнатального периода онтогенеза асфиксией CO<sub>2</sub>. Крыс содержали в стандартных условиях вивария. Протокол исследования одобрен решением ЛЭК ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России № 8475/1 от 30.11.2020.

Животных и их сердца взвешивали на лабораторных весах (“HL-100”, Япония) для подсчета относительной массы сердца по формуле: [масса сердца (г)/масса крысы (г)] × 100%. Сердца крыс фиксировали 12–24 ч в забуференном (рН 7.4) формалине (“БиоВитрум”, Россия), промывали в проточной воде, обезвоживали в Isorger (“БиоВитрум”) и пропитывали парафиновой смесью HISTOMIX (“БиоВитрум”). Приготовленные на автоматическом микротоме HM355S (“Thermo Fisher Scientific”, Китай) срезы толщиной 5 мкм использовали для иммуногистохимического анализа.

На полученных срезах выявляли матриксные металлопротеиназы 2 и 9, используя в качестве первичных антител NCL-MMP2-507 и NCL-MMP9-439 (“Novocastra”, Германия) в разведении 1 : 500. Проводили высокотемпературную демаскировку антигенов в цитратном буфере (0.01 М; рН 6.0). Для минимизации неспецифического окрашивания срезы инкубировали в течение 10 мин с “Peroxidase Block” (“Abcam”, Велико-

британия), а затем в течение 10 мин с “Protein Block” (“Abcam”). Срезы инкубировали с первичными антителами в течение 45 мин при температуре 25°C. Иммуногистохимическую реакцию визуализировали с помощью системы детекции “Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit – Micro-polymer” (“Abcam”), после чего срезы докрашивали гематоксилином Джилла. Постановку отрицательного контроля антител осуществляли нанесением на срезы вместо первичных антител раствора для разведения антител “Ab Diluent” (“Abcam”). Реакцию оценивали в стенке левого желудочка сердца экспериментальных животных.

Исследование и фотосъемку микропрепаратов проводили с помощью светового микроскопа Axioscope 40 (“Zeiss”, Германия) и цифровой камеры CanonG5 (“Canon”, Китай).

На фотографиях, полученных с гистологических препаратов, с помощью программы ImageJ 1.48 (“NIH”, США) измеряли толщину стенки левого желудочка крыс.

Статистический анализ проведен с помощью SPSS 16.0 (“IBM”, США) с использованием критериев Шапиро–Уилка и Манна–Уитни. Данные представлены в виде медианы и квартилей – Me(Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>). Различия между показателями считали достоверными при уровне значимости  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Получение преждевременно рожденного потомства.** Инъекция мифепристона беременным крысам является надежным способом индукции преждевременных родов. Введение мифепристона на 20 и 20.5 сут беременности крысам приводит к началу родов через 18–24 ч. Полученное преждевременно рожденное потомство является жизнеспособным. Отмечали гибель отдельных особей на 1–3 сут постнатального периода онтогенеза среди крыс 2-ой группы. Стоит отметить, что крысы, рожденные на 36 ч ранее срока, являются нежизнеспособными.

В ходе постнатального периода онтогенеза отмечается увеличение массы крыс всех исследуемых групп. Масса крыс 1-ой и 2-ой групп на 7 и 21 сут постнатального периода онтогенеза меньше, чем масса крыс контрольной группы (табл. 1). На 21 сут постнатального периода онтогенеза минимальные значения массы тела отмечены у крыс 2-ой группы.

**Характеристика сердца преждевременно рожденных крыс.** Значения относительной массы сердца и толщины стенки левого желудочка экспериментальных животных отражены в табл. 1. На 7 сут постнатального периода онтогенеза не наблюдается отличия относительной массы сердца и толщины стенки левого желудочка крыс контрольной, 1-ой и 2-ой групп. Относительная мас-

**Таблица 1.** Морфометрические показатели преждевременно рожденных крыс и их сердца, Me(Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>)

| Экспериментальная группа                    | Срок постнатального периода онтогенеза, сут |                                      |
|---|---|--------------------------------------|
|   | 7   | 21                                   |
| Масса крыс, г                               |   |                                      |
| контрольная группа                          | 15.2 (14.7; 16.3)                           | 43.7 (41.4; 47.1) <sup>a</sup>       |
| группа 1                                    | 13.7 (12.4; 14.6) <sup>б</sup>              | 44.3 (40.7; 49.3) <sup>a</sup>       |
| группа 2                                    | 12.1 (11.3; 13.3) <sup>б</sup>              | 37.5 (35.5; 40.2) <sup>a, б, в</sup> |
| Относительная масса сердца, %               |   |                                      |
| контрольная группа                          | 0.73 (0.67; 0.75)                           | 0.73 (0.68; 0.77)                    |
| группа 1                                    | 0.73 (0.69; 0.81)                           | 0.75 (0.67; 0.81)                    |
| группа 2                                    | 0.74 (0.68; 0.80)                           | 0.80 (0.75; 0.85) <sup>б</sup>       |
| Толщина стенки левого желудочка сердца, мкм |   |                                      |
| контрольная группа                          | 719.2 (682.9; 811.4)                        | 1140.4 (975.6; 1250.3) <sup>a</sup>  |
| группа 1                                    | 743.3 (695.1; 811.4)                        | 832.1 (748.4; 917.3) <sup>a, б</sup> |
| группа 2                                    | 693.7 (655.6; 786.8)                        | 871.8 (855.6; 943.7) <sup>a, б</sup> |

Примечание. Контрольная группа – срок гестации 22 сут, 1-ая группа – срок гестации 21.5 сут, 2-ая группа – срок гестации 21 сут. Различия достоверны при  $p \leq 0.05$  при сравнении с соответствующим показателем (а) на предыдущем сроке, (б) в контрольной группе, (в) в 1-ой группе.

са сердца крыс 2-ой группы превышает соответствующий показатель крыс контрольной и 1-ой групп на 21 сутки постнатального периода онтогенеза. Толщина стенки левого желудочка крыс контрольной, 1-ой и 2-ой групп возрастает в ходе постнатального периода онтогенеза. На 21 сут постнатального периода онтогенеза толщина стенки левого желудочка крыс контрольной группы превышает соответствующий показатель сердца крыс 1-ой и 2-ой групп.

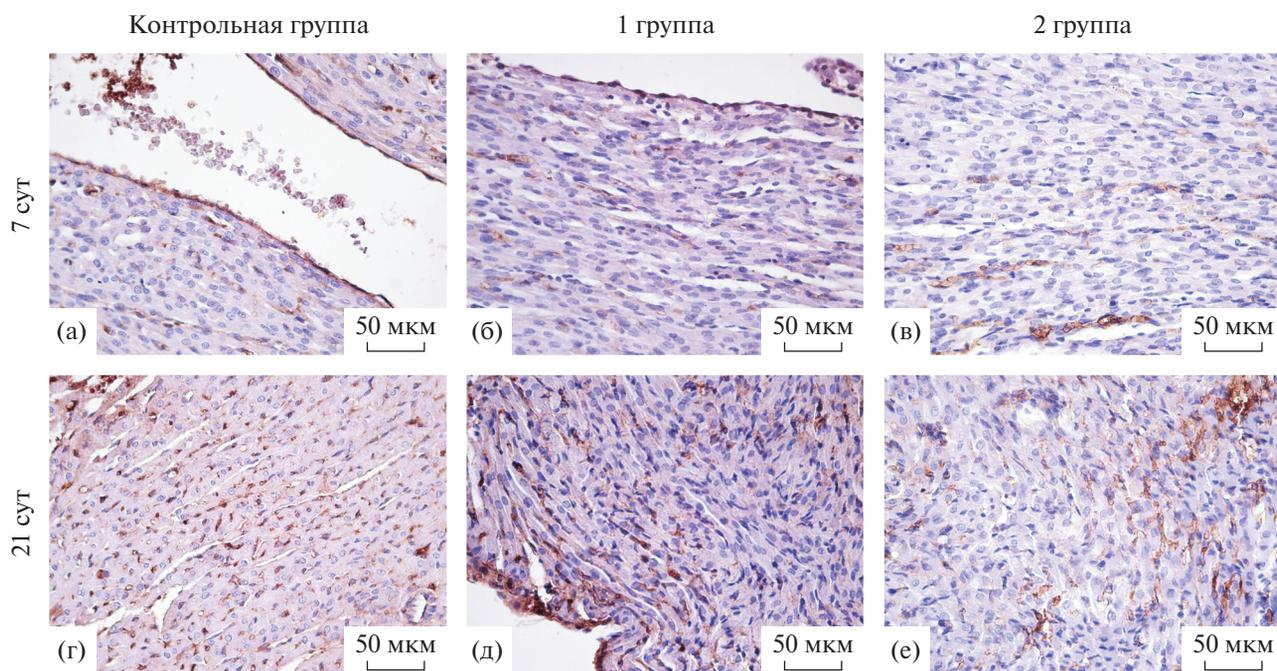
**Выявление MMP2 в стенке левого желудочка преждевременно рожденных крыс.** У крыс контрольной, 1-ой и 2-ой групп в стенке левого желудочка в наблюдаемые сроки определяется схожий паттерн MMP2-позитивного окрашивания. Иммунопозитивное окрашивание характерно для эндотелиоцитов эндокарда, фибробластов миокарда, мезотелиоцитов эпикарда и эндотелиоцитов кровеносных сосудов сердца крыс. На 7 сут постнатального периода онтогенеза MMP2-позитивное окрашивание характеризуется умеренной интенсивностью и наиболее выражено в субэпикардальных участках стенки левого желудочка крыс (рис. 1). На 21 сут постнатального периода онтогенеза в стенке левого желудочка крыс определяется диффузное MMP2-позитивное окрашивание высокой интенсивности (рис. 1). У крыс 2-ой группы на 21 сут постнатального периода онтогенеза определяется более выраженная MMP2-позитивная реакция периваскулярной стромы, чем у крыс контрольной и 1-ой групп.

**Выявление MMP9 в стенке левого желудочка преждевременно рожденных крыс.** MMP9-позитивное

окрашивание определяется в стенке левого желудочка крыс всех исследуемых групп на 7 и 21 сут постнатального периода онтогенеза. Количество MMP9-позитивных структур в стенке левого желудочка возрастает в ходе онтогенеза у крыс контрольной, 1-ой и 2-ой групп. Иммунопозитивными являются эндотелиоциты эндокарда, фибробласты миокарда, мезотелиоциты эпикарда и эндотелиоциты кровеносных сосудов сердца крыс. На 7 и 21 сут постнатального периода онтогенеза MMP9-позитивное окрашивание определяется в эндокарде, субэндокардиальных и субэпикардальных участках миокарда левого желудочка крыс (рис. 2). Количество иммунопозитивных структур, а также степень интенсивности иммунного окрашивания на 7 сут постнатального периода онтогенеза представляется большей в стенке левого желудочка крыс контрольной группы, по сравнению с таковыми животных 1-ой и 2-ой групп. На 21 сут постнатального периода онтогенеза количество MMP9-позитивных структур, а также степень интенсивности иммунного окрашивания в стенке левого желудочка крыс контрольной группы визуально меньше, чем у животных 1-ой и 2-ой групп.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В раннем постнатальном периоде онтогенеза возрастающая гемодинамическая нагрузка индуцирует структурные преобразования в сердце, затрагивающие как клетки, так и межклеточное вещество. Ремоделирование межклеточного вещества в ходе постнатального кардиоморфогенеза является



**Рис. 1.** Фрагмент стенки левого желудочка крысы контрольной группы – срок гестации 22 сут (а, г), 1-ой группы – срок гестации 21.5 сут (б, д), 2-ой группы – срок гестации 21 сут (в, е) на 7 и 21 сут постнатального периода онтогенеза. Иммуногистохимическая реакция на MMP2 с докраской гематоксилином Джилла. MMP2-позитивное окрашивание умеренной (а, б, в) и высокой (г, д, е) интенсивности.

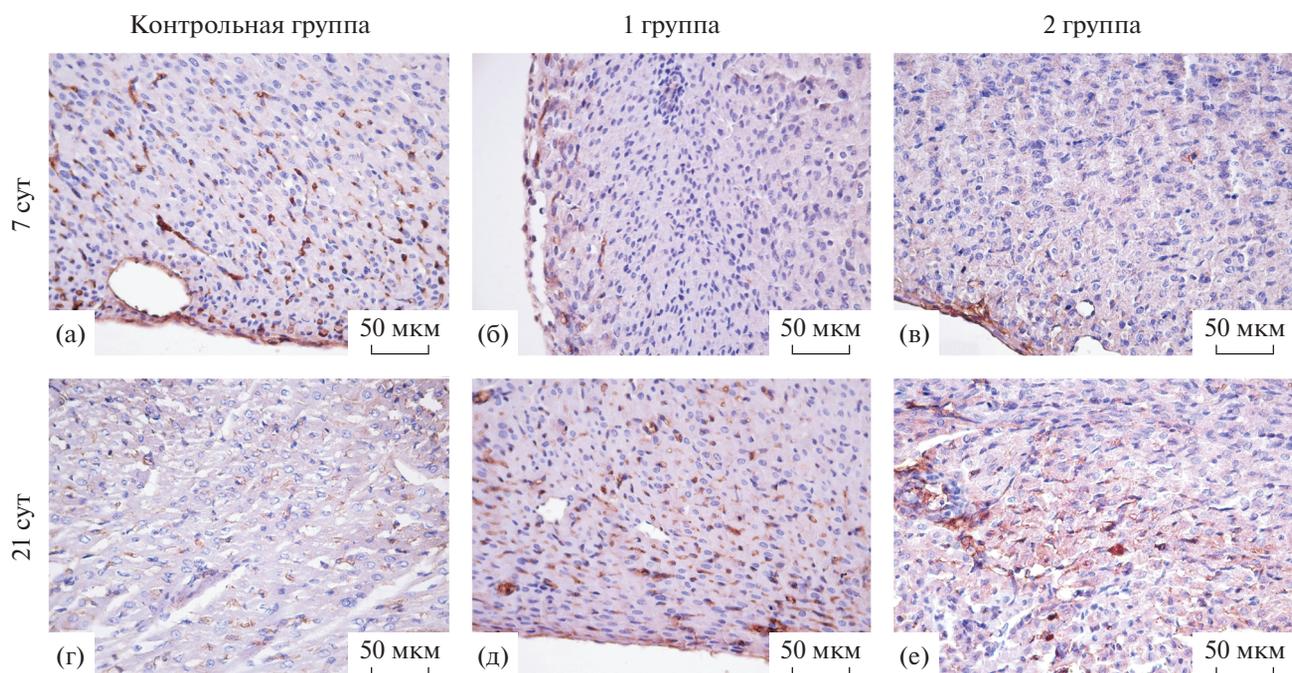
нормальным процессом, заключающимся в сбалансированных процессах деградации и синтеза его компонентов. В ходе постнатального периода онтогенеза в сердце показано снижение экспрессии фибронектина, гиалуроновой кислоты и протеогликанов и накопление коллагенов (I и III типов) и ламинина (Silva *et al.*, 2021). Накопление коллагенов в межклеточном веществе миокарда способствует увеличению степени упорядоченности миофибрилл в цитоплазме кардиомиоцитов, а также ассоциировано с угнетением активности клеточного цикла кардиомиоцитов (Yahalom-Ronen *et al.*, 2015).

Мишенями MMP2 и MMP9 являются компоненты межклеточного матрикса (коллагены I и IV типов, ламинин), цитокины и хемокины (DeCoux *et al.*, 2014). Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о множественных, подчас противоположных эффектах матриксных металлопротеиназ в сердце, реализуемых различными механизмами. MMP2 и MMP9, разрушая компоненты межклеточного вещества, влияют на его архитектуру. Кроме того, продукты деградации компонентов межклеточного вещества – матрикины – являются биологически активными молекулами. В частности, матрикины, образующиеся в результате частичного протеолиза MMP2 и MMP9 коллагена I типа, регулируют электрическую активность и клеточную гибель кардиомиоцитов, пролиферацию и миграцию миофибробластов,

модулируют ангиогенез, являются мощными активаторами нейтрофильных гранулоцитов, служат хемоаттрактантами макрофагов и тучных клеток, а также способны модулировать экспрессию и активность самих матриксных металлопротеиназ (Maquart *et al.*, 2004). Стоит отметить, что содержание матриксных металлопротеиназ в раннем постнатальном периоде онтогенеза в норме изучена недостаточно (Kandasamy *et al.*, 2010).

Преждевременное рождение крыс ассоциировано с меньшей массой тела в раннем постнатальном периоде онтогенеза. Меньшая масса преждевременно рожденных животных, вероятно, является причиной более низких абсолютных морфометрических показателей сердца, таких как толщина стенки левого желудочка. Для выявления закономерностей, не связанных с размерами животных, предпочтительно анализировать относительные морфометрические показатели сердца.

Нами продемонстрировано, что у преждевременно рожденных крыс наблюдается увеличение относительной массы сердца уже в раннем постнатальном периоде онтогенеза. Одним из возможных механизмов ремоделирования сердца является изменение активности матриксных металлопротеиназ, которое может наблюдаться с первых дней постнатального периода онтогенеза и приводить к ранним структурным изменениям стенки сердца (Tong *et al.*, 2011).



**Рис. 2.** Фрагмент стенки левого желудочка крысы контрольной группы – срок гестации 22 сут (а, г), 1-ой группы – срок гестации 21.5 сут (б, д), 2-ой группы – срок гестации 21 сут (в, е) на 7 и 21 сут постнатального периода онтогенеза. Иммуногистохимическая реакция на MMP9 с докраской гематоксилином Джилла. MMP9-позитивное окрашивание умеренной (б, в, г) и высокой (а, д, е) интенсивности.

Показано, что преждевременное рождение ассоциировано с окислительным стрессом (Falsaperla *et al.*, 2020). Активные формы кислорода и азота индуцируют транскрипцию генов матричных металлопротеиназ, а также непосредственно активируют проферменты (Siwik, Colucci, 2004; Bavineni *et al.*, 2019). Известно, что у детей, рожденных на 33–36 неделе беременности активность MMP2 и MMP9 в ходе 1 мес. постнатального периода онтогенеза выше, чем у детей, рожденных в срок (Schulz *et al.*, 2004). Увеличение активности MMP2 и MMP9 в плазме крови продемонстрировано в раннем постнатальном периоде онтогенеза у детей с врожденными дефектами межжелудочковой перегородки. Активность матричных металлопротеиназ положительно коррелирует со степенью тяжести заболевания (Cheng *et al.*, 2013). Какое влияние оказывает преждевременное рождение на содержание матричных металлопротеиназ в сердце в раннем постнатальном периоде онтогенеза не изучено.

Деградация компонентов межклеточного вещества матричными металлопротеиназами в раннем постнатальном периоде онтогенеза наблюдается при увеличении размеров и изменении формы кардиомиоцитов, а также при установлении клеточных контактов между ними. Показано, что гипертрофия кардиомиоцитов сопровождается активацией MMP2 (Verzola *et al.*, 2006). Нами продемонстрирован высокий уровень экспрессии

MMP2 в стенке левого желудочка как доношенных, так и преждевременно рожденных крыс в период, соответствующий активному гипертрофическому росту миокарда (7 и 21 сут постнатального периода онтогенеза).

Ангиогенез, активно протекающий в сердце крыс в раннем постнатальном периоде онтогенеза, индуцируется MMP9 и сопровождается повышением активности MMP2 (Bellafiore *et al.*, 2013). Экспрессия MMP2 и MMP9 в эндотелиоцитах развивающихся кровеносных сосудов в субэпикардиальных участках миокарда свидетельствует об их участии в ангиогенезе.

Интересным представляется тот факт, что экспрессия MMP9 в сердце преждевременно рожденных крыс на 21 сут постнатального периода онтогенеза превышает таковую у контрольных животных. Известно, что MMP9 играет ключевую роль в дезадаптивном ремоделировании сердца в условиях патологии (DeCoux *et al.*, 2014; DeLeon-Pennell *et al.*, 2017). В экспериментах *in vivo* продемонстрировано, что угнетение экспрессии или активности MMP9 приводит к снижению воспалительной реакции и степени ремоделирования сердца (Turner, Porter, 2012).

\*\*\*

Таким образом, преждевременное рождение у крыс не оказывает влияния на содержание MMP2

в стенке левого желудочка в исследуемые сроки, тогда как содержание MMP9 снижается на 7 сут и увеличивается на 21 сут постнатального периода онтогенеза, по сравнению с таковым у доношенных крыс. Стоит отметить, что иммуногистохимическое исследование не позволяет дифференцировать латентную и активную формы матриксных металлопротеиназ. Кроме того, требуется дальнейшее исследование, целью которого будет анализ экспрессии и активности ингибиторов матриксных металлопротеиназ в сердце преждевременно рожденных животных.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Программы стратегического академического лидерства “Приоритет – 2030”.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bavineni M., Wassenaar T.M., Agnihotri K., Ussery D.W., Lüscher T.F., Mehta J.L.* Mechanisms linking preterm birth to onset of cardiovascular disease later in adulthood // *Eur. Heart J.* 2019. V. 40. P. 1107–1112.
- Bellafiore M., Battaglia G., Bianco A., Farina F., Palma A., Paoli A.* The involvement of MMP-2 and MMP-9 in heart exercise-related angiogenesis // *J. Transl. Med.* 2013. V. 11. 283.  
<https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-283>
- Blencowe H., Cousens S., Oestergaard M.Z., Chou D., Moller A.B., Narwal R., Adler A., Vera Garcia C., Rohde S., Say L., Lawn J.E.* National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications // *Lancet.* 2012. V. 379. P. 2162–2172.
- Carr H., Cnattingius S., Granath F., Ludvigsson J.F., Edstedt Bonamy A.K.* Preterm Birth and Risk of Heart Failure Up to Early Adulthood // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2017. V. 69. P. 2634–2642.
- Cheng K.S., Liao Y.C., Chen M.Y., Kuan T.C., Hong Y.H., Ko L., Hsieh W.Y., Wu C.L., Chen M.R., Lin C.S.* Circulating matrix metalloproteinase-2 and -9 enzyme activities in the children with ventricular septal defect // *Int. J. Biol. Sci.* 2013. V. 9. P. 557–563.
- Crump C., Howell E.A., Stroustrup A., McLaughlin M.A., Sundquist J., Sundquist K.* Association of Preterm Birth With Risk of Ischemic Heart Disease in Adulthood // *JAMA Pediatr.* 2019. V. 173. P. 736–743.
- DeCoux A., Lindsey M.L., Villarreal F., Garcia R.A., Schulz R.* Myocardial matrix metalloproteinase-2: inside out and upside down // *J. Mol. Cell Cardiol.* 2014. V. 77. P. 64–72.
- DeLeon-Pennell K.Y., Meschiari C.A., Jung M., Lindsey M.L.* Matrix Metalloproteinases in Myocardial Infarction and Heart Failure // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2017. V. 147. P. 75–100.
- Dudley D.J., Branch D.W., Edwin S.S., Mitchell M.D.* Induction of preterm birth in mice by RU486 // *Biol. Reprod.* 1996. V. 55. P. 992–995.
- Falsaperla R., Lombardo F., Filasco F., Romano C., Saporito M., Puglisi F., Piro E., Ruggieri M., Pavone P.* Oxidative Stress in Preterm Infants: Overview of Current Evidence and Future Prospects // *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*. 2020. V. 13. 145.  
<https://doi.org/10.3390/ph13070145>
- Goss K.N., Haraldsdottir K., Beshish A.G., Barton G.P., Watson A.M., Palta M., Chesler N.C., Francois C.J., Wieben O., Eldridge M.W.* Association Between Preterm Birth and Arrested Cardiac Growth in Adolescents and Young Adults // *JAMA Cardiol.* 2020. V. 5. P. 910–919.
- Huckstep O.J., Williamson W., Telles F., Burchert H., Bertagnolli M., Herdman C., Arnold L., Smillie R., Mohamed A., Boardman H., McCormick K., Neubauer S., Leeson P., Lewandowski A.J.* Physiological Stress Elicits Impaired Left Ventricular Function in Preterm-Born Adults // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2018. V. 71. P. 1347–1356.
- Kandasamy A.D., Chow A.K., Ali M.A., Schulz R.* Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix // *Cardiovasc. Res.* 2010. V. 85. P. 413–423.
- Lapidaire W., Clark C., Fewtrell M.S., Lucas A., Leeson P., Lewandowski A.J.* The Preterm Heart-Brain Axis in Young Adulthood: The Impact of Birth History and Modifiable Risk Factors // *J. Clin. Med.* 2021. V. 10(6). 1285.  
<https://doi.org/10.3390/jcm10061285>
- Lewandowski A.J., Levy P.T., Bates M.L., McNamara P.J., Nuyt A.M., Goss K.N.* Impact of the Vulnerable Preterm Heart and Circulation on Adult Cardiovascular Disease Risk // *Hypertension.* 2020. V. 76. P. 1028–1037.
- Maquart F.X., Pasco S., Ramont L., Hornebeck W., Monboisse J.C.* An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity. Implication in tumor invasion // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2004. V. 49. P. 199–202.
- Mohamed A., Marciniak M., Williamson W., Huckstep O.J., Lapidaire W., McCance A., Neubauer S., Leeson P., Lewandowski A.J.* Association of Systolic Blood Pressure Elevation With Disproportionate Left Ventricular Remodeling in Very Preterm-Born Young Adults: The Preterm Heart and Elevated Blood Pressure // *JAMA Cardiol.* 2021. V. 6. P. 821–829.
- Schulz C.G., Sawicki G., Lemke R.P., Roeten B.M., Schulz R., Cheung P.Y.* MMP-2 and MMP-9 and their tissue inhibitors in the plasma of preterm and term neonates // *Pediatr. Res.* 2004. V. 55. P. 794–801.
- Silva A.C., Pereira C., Fonseca A.C.R.G., Pinto-do-Ó P., Nascimento D.S.* Bearing My Heart: The Role of Extracellular Matrix on Cardiac Development, Homeostasis, and Injury Response // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. V. 8. 621644.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.621644>
- Siwik D.A., Colucci W.S.* Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium // *Heart Fail. Rev.* 2004. V. 9. P. 43–51.
- Turner N.A., Porter K.E.* Regulation of myocardial matrix metalloproteinase expression and activity by cardiac fibroblasts // *IUBMB Life.* 2012. V. 64. P. 143–150.
- Tong W., Xue Q., Li Y., Zhang L.* Maternal hypoxia alters matrix metalloproteinase expression patterns and causes cardiac remodeling in fetal and neonatal rats // *Am.*

- J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2011. V. 301. H2113–H2121.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00356.2011>
- Verzola R.M.M., Mesquita R.A., Peviani S., Ramos O.H.P., Moriscot A.S., Perez S.E.A., Selistre-de-Araújo H.S.* Early remodeling of rat cardiac muscle induced by swimming training // Braz. J. Med. Biol. Res. 2006. V. 39. P. 621–627.
- Walani S.R.* Global burden of preterm birth // Int. J. Gynaecol. Obstet. 2020. V. 150. P. 31–33.
- Yahalom-Ronen Y., Rajchman D., Sarig R., Geiger B., Tzahor E.* Reduced matrix rigidity promotes neonatal cardiomyocyte dedifferentiation, proliferation and clonal expansion // Elife. 2015. V. 4. e07455.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.07455>

## Matrix Metalloproteinases Detection in the Heart of Preterm Rats

V. V. Ivanova<sup>1, #</sup>, I. V. Milto<sup>1, 2</sup>, O. N. Serebryakova<sup>1</sup>, and I. V. Sukhodolo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University, 2 Moskovsky trakt, Tomsk, 634050 Russia

<sup>2</sup> Seversk Biophysical Research Center, PO box № 130, Seversk-13, 636013 Russia

<sup>#</sup>e-mail: ivvera92@rambler.ru

The influence of preterm birth on the expression of matrix metalloproteinases (MMP2 and MMP9) in the wall of the left ventricle of the rat heart in the early postnatal period of ontogenesis (up to 21 days) was studied. Heart of preterm (gestation duration 21 and 21.5 days) and term (gestation duration 22 days) Wistar rats on days 7 and 21 of the postnatal period of ontogenesis were studied immunohistochemically in the experiment. Preterm birth has no effect on the pattern of immunohistochemical staining of MMP2 in the wall of the left ventricle of rats, while the content of MMP9 decreases by day 7 and increases by day 21 of the postnatal period of ontogenesis, compared with that of term rats.

*Keywords:* preterm birth, postnatal development, heart, matrix metalloproteinases, experiment

УДК 593.16(06)(285.2)

## РАЗНООБРАЗИЕ И ДИНАМИКА СООБЩЕСТВ ГЕТЕРТРОФНЫХ ЖГУТИКОНОСЦЕВ В ЛИТОРАЛИ КРУПНОГО РАВНИННОГО ВОДОХРАНИЛИЩА

© 2022 г. Н. Г. Косолапова\*, @, Е. В. Кузнецова\*, Д. Б. Косолапов\*, \*\*

\*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, пос. Борок, 109,  
Некоузский р-н, Ярославская обл., 152742 Россия

\*\*Череповецкий государственный университет, просп. Луначарского, 5, Вологодская обл., Череповец, 162600 Россия

@E-mail: kng@ibiw.ru

Поступила в редакцию 02.02.2021 г.

После доработки 29.04.2021 г.

Принята к публикации 30.04.2021 г.

В течение 4-х лет в весенне-летний период изучали видовой состав и структуру сообществ планктонных гетеротрофных жгутиконосцев (нанофлагеллят, ГНФ) разнотипных прибрежных мелководий Рыбинского водохранилища (Верхняя Волга), в том числе, испытывающих влияние жизнедеятельности колониальных птиц. Идентифицированы 105 видов и форм ГНФ из 13 крупных таксонов и группы неопределенного систематического положения. На всех исследованных участках наибольшим числом видом были представлены таксоны Choanoflagellida и Chrysomonadida. В прибрежных мелководьях, испытывающих влияние колониальных поселений птиц, встречалось меньше видов ГНФ, чем на участках вне зон этого влияния. Общими для всех участков литорали были 35 видов, из них 3 вида (*Bodo designis*, *Paraphysomonas imperforata* и *Spumella* sp. 1) имели высокую частоту встречаемости ( $\geq 50\%$ ). Однако основу разнообразия ГНФ составляли виды, частота встречаемости которых была  $\leq 20\%$ , и которые занимали более половины списка видов во всех биотопах.

**Ключевые слова:** гетеротрофные жгутиконосцы, видовое разнообразие, литораль водохранилища, влияние колоний птиц

DOI: 10.31857/S1026347022050110

Понимание структурно-функциональной организации экосистемы во многом основано на знаниях о взаимодействии видов в ее трофических сетях, в процессе которых осуществляются круговороты веществ и энергии (Pomeroy, 1974). С появлением концепции “микробной петли” или “микробной трофической сети” (Azam *et al.*, 1983; Sherr, Sherr, 1988), исследования межмикробных взаимодействий лежат в основе понимания структуры и функций всей трофической сети, поскольку микроорганизмы играют ведущие роли в минерализации органических веществ, круговоротах биогенных элементов, формировании биомассы и продуктивности водных экосистем. Гетеротрофные жгутиконосцы (нанофлагелляты, ГНФ) являются постоянными компонентами микробной трофической сети, главными потребителями пикопланктона и важными пищевыми объектами для инфузорий и многоклеточного зоопланктона (Laybourn-Parry, Parry 2000; Weisse, 2002; Auer *et al.*, 2004).

Исследования ГНФ Рыбинского водохранилища (Верхняя Волга) имеют многолетнюю исто-

рию, однако, в основном, они ограничивались глубоководной частью водоема и редко затрагивали прибрежно-мелководные участки (Жуков, 1989, 2001; Косолапова, 2018). Вместе с тем литоральная зона занимает значительную часть акватории водохранилища, служит местом нереста рыб и гнездования птиц, отличается резкими колебаниями физико-химических условий и своеобразием биологических сообществ (Рыбинское водохранилище..., 1972). Находясь на границе водной и наземной сред, прибрежные мелководья водохранилищ характеризуются открытостью и по сравнению с мелководьями озер обладают специфическими чертами, обусловленными, в первую очередь, нестабильностью уровня режима (Буторин, 1984). Сезонная и межгодовая динамика численности и биомассы ГНФ на разнотипных участках литорали Рыбинского водохранилища описана нами ранее (Румянцева и др., 2013, 2015, 2016).

Цель настоящей работы – изучить динамику разнообразия и структуры сообщества ГНФ в прибрежных мелководьях Рыбинского водохра-

нилища, в том числе испытывающих влияние колониальных поселений птиц.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в 2009–2011 и 2013 гг. на прибрежно-мелководных участках Рыбинского водохранилища вблизи поселений колониальных птиц: в защищенной зарастающей литорали среди гнездовой птиц сем. Чайковых (Laridae) и сем. Крачковых (Sternidae) (ст. Ч) и в открытой литорали около колонии серой цапли (*Ardea cinerea* L.) (ст. Ц). Одновременно отбор проб воды производили на фоновых участках, расположенных на расстоянии 200–500 м от соответствующих птичьих колоний (ст. ФЧ и ФЦ), где гидрологические параметры были примерно такими же, как на станциях Ч и Ц. Сроки и периодичность отбора проб были выбраны в связи с особенностями биологии птиц, в первую очередь, с учетом сроков их гнездования. С середины мая до середины июля, в период максимальной орнитогенной нагрузки, когда вылуплялись и активно выкармливались птенцы, отбор проб производили еженедельно. До и после этого периода периодичность отбора составляла 1 раз в две недели.

Определение видового состава бесцветных жгутиконосцев проводили с помощью фазово-контрастной микроскопии в нефиксированных пробах с использованием микроскопа AxioScore A1 (“Carl Zeiss”, Германия). Пробы воды просматривали в течение недели для более полного изучения видового состава жгутиконосцев (Методика изучения ..., 1975; Vørgs, 1992). Для идентификации жгутиконосцев использовали известные руководства (Ветрова, 1980; Жуков, 1993; Lee, Paterson, 2000; Lee, 2015).

Анализ полученных данных проводили, используя принятые в гидробиологии показатели: число видов (S), частота встречаемости (P, %), альфа-разнообразие, т.е. среднее число видов в пробе. Бета-разнообразие ( $\beta$ ) сообществ гетеротрофных нанофлагеллят рассчитывали по формуле Р. Уиттекера:

$$\beta = (S/\alpha) - 1, \text{ где } S - \text{общее число видов, } \alpha - \text{среднее количество видов в сообществах (Уиттекер, 1980).}$$

В местах отбора проб измеряли температуру воды, концентрацию растворенного кислорода и биохимическое потребление кислорода (БПК<sub>5</sub>). Условия обитания литоральных микробных сообществ описаны нами ранее (Румянцева и др., 2015).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

За весь период исследований в литорали Рыбинского водохранилища идентифицировано

105 видов и форм гетеротрофных жгутиконосцев, относящихся к 13 крупным таксонам и группе неопределенного систематического положения. Основу разнообразия на всех исследованных биотопах составляли представители Choanoflagellida (22 вида) и Chrysomonadida (16 видов) (табл. 1). Остальные таксономические группы содержали в своем составе от 1 до 14 видов. Максимальное число видов зарегистрировано на ст. ФЧ (81), минимальное – на ст. Ц (48 видов). Общими для всех исследованных сообществ были 35 видов, что составляет 33% общего количества определенных видов, из которых 3 вида (*Bodo designis*, *Paraphysomonas imperforata* и *Spumella* sp.1) имели высокую частоту встречаемости ( $P \geq 50\%$ ). Наибольшее число постоянных видов (7) обнаружено на ст. Ч, а наименьшее – на ст. Ц (3 вида). На фоновых участках зарегистрировано 6 (ст. ФЧ) и 5 (ст. ФЦ) постоянных видов. Некоторые виды имели высокую частоту встречаемости только на одном из исследованных участков: это *Paraphysomonas vestita* на ст. ФЧ, *Codosiga botritis* на ст. Ч и *Ancyromonas sigmoides* на ст. ФЦ. На ст. Ц таких видов не обнаружено. Некоторые виды ГНФ были приурочены лишь к одному биотопу. Наибольшее число таких специфических видов (по 11) зарегистрировано в закрытой литорали (ст. ФЧ и Ч), наименьшее (1 вид) – на ст. Ц, на ст. ФЦ таких видов было 6. Межгодовые исследования фауны ГНФ показали, что наибольшее число видов обнаружено в 2011 г. на ст. ФЧ (65 видов), а наименьшее (31 вид) – в 2009 г. на ст. Ц (рис. 1). Причем на фоновых участках количество видов было больше, чем на участках, заселенных птицами. Исключение составил 2013 г., когда число видов на ст. Ч было выше, чем на ст. ФЧ.

Наибольшим видовым разнообразием в сообществе ГНФ защищенной литорали во все годы наблюдений характеризовались хризифитовые. Больше всего представителей этой группы обнаружено на станциях Ч и ФЧ в 2011 г.: 14 и 13 видов соответственно. В представленности других эколого-таксономических групп в закрытой литорали наблюдались некоторые различия. Так, в составе сообщества ГНФ в 2009 г. на ст. ФЧ преобладали три группы: хоанофлагелляты, кинетопластиды и церкомонадины, а на ст. Ч только кинетопластиды (рис. 2а). В 2010 г. в этих биотопах содоминирующей группой были кинетопластиды, а в 2011 – хоанофлагелляты. В 2013 г. на станциях ФЧ и Ч часто встречались церкомонады, а на ст. ФЧ еще и эвгленовые.

В открытой литорали в 2009 г. на ст. ФЦ по числу видов доминировали кинетопластиды, а на ст. Ц – хризомонадины (рис. 2б). В 2010 г. на ст. ФЦ наибольшим разнообразием отличались хоанофлагелляты и хризифитовые, а на ст. Ц – хризифитовые и кинетопластиды. Меньше всего за весь период исследований как в закрытой, так в от-

**Таблица 1.** Видовой состав и частота встречаемости ГНФ на разных участках прибрежных мелководий Рыбинского водохранилища

| Вид  | 2009–2011, 2013 гг. |    | 2009–2010 гг. |    |
|--|---------------------|----|---------------|----|
|  | ФЧ                  | Ч  | ФЦ            | Ц  |
| Mastigamoebidae Goldschmidt, 1907                          |                     |    |               |    |
| <i>Mastigomaeba limax</i> Moroff, 1904                     | –                   | 2  | –             | –  |
| Choanomonada Kent, 1880                                    |                     |    |               |    |
| <i>Aulomonas purdyi</i> Lackey, 1942                       | –                   | –  | 5             | –  |
| <i>Codosiga botritis</i> Kent, 1880                        | 43                  | 53 | 32            | 27 |
| <i>Codonosiga</i> sp.                                      | –                   | –  | 5             | –  |
| <i>Codonosigopsis robini</i> Senn, 1900                    | –                   | 7  | –             | –  |
| <i>Desmarella irregularis</i> Stokes, 1888                 | –                   | 2  | –             | –  |
| <i>Diplosiga socialis</i> Frenzel, 1892                    | –                   | –  | 5             | –  |
| <i>Kentrosiga setifera</i> Schiller, 1953                  | 2                   | –  | –             | –  |
| <i>Lagenoeca globulosa</i> France 1897                     | 2                   | –  | 5             | –  |
| <i>L. ruttneri</i> Bourrelly, 1952                         | 4                   | 2  | –             | –  |
| <i>Monosiga ovata</i> Kent, 1880                           | 45                  | 33 | 41            | 36 |
| <i>Monosiga</i> sp.  | –                   | 5  | 5             | 5  |
| <i>Protospongia haeckeli</i> Kent, 1880                    | 7                   | 5  | –             | –  |
| <i>Salpingoeca amphoridium</i> Clark, 1868                 | 2                   | –  | –             | 5  |
| <i>S. convallaria</i> Stein, 1878                          | –                   | –  | 5             | –  |
| <i>S. globulosa</i> Zhukov, 1978                           | 4                   | –  | –             | –  |
| <i>S. gracilis</i> Clark, 1868                             | 7                   | 7  | –             | –  |
| <i>S. minor</i> Dangeard, 1910                             | 24                  | 28 | 18            | 5  |
| <i>S. minuta</i> Kent, 1880                                | 20                  | 9  | 5             | –  |
| <i>S. oblonga</i> Stein, 1878                              | 2                   | –  | –             | –  |
| <i>S. pixidium</i> Kent, 1880                              | 4                   | 2  | –             | –  |
| <i>S. urnula</i> Skuja, 1948                               | 7                   | 5  | –             | 5  |
| <i>S. vagenicola</i> Stein, 1878                           | –                   | 2  | –             | –  |
| Bicosoecida Grassè and Deflandre, 1952                     |                     |    |               |    |
| <i>Bicosoeca crystallina</i> (Lackey) Skuja, 1956          | 4                   | –  | –             | –  |
| <i>B. conica</i> Lemmerman, 1914                           | 4                   | 5  | 5             | 5  |
| <i>B. cylindrica</i> (Lackey) Bourrelly, 1951              | 4                   | 2  | –             | –  |
| <i>B. exilis</i> Penard, 1921                              | 20                  | 5  | 9             | 5  |
| <i>B. fotti</i> Bourrelly, 1951                            | –                   | –  | 5             | –  |
| <i>B. lacustris</i> Skuja, 1948                            | 27                  | 16 | 14            | 9  |
| <i>B. ovata</i> Lemmerman, 1914                            | –                   | 2  | –             | –  |
| <i>B. planctonica</i> Kisselew, 1931                       | 9                   | –  | –             | –  |
| <i>Cafeteria roenbergensis</i> Fenchel and Patterson, 1990 | 4                   | 5  | –             | –  |
| <i>Cyathobodo</i> sp.                                      | 2                   | –  | –             | –  |
| <i>Pseudodendromonas vlkii</i> (Vlk, 1938) Bourrelly, 1953 | –                   | 2  | –             | –  |
| Chrysophyceae Pascher, 1914                                |                     |    |               |    |
| <i>Anthophisa vegetans</i> (O.F.M.) Stein, 1878            | 7                   | 23 | –             | –  |
| <i>Cladomonas fruticulosa</i> Stein, 1878                  | –                   | 5  | –             | –  |
| <i>Dendromonas cryptostilus</i> Skuja, 1948                | –                   | 2  | –             | –  |
| <i>Paraphisomonas imperforata</i> Lucas, 1967              | 51                  | 60 | 68            | 55 |
| <i>P. vestita</i> (Stokes) De Saedeleer, 1929              | 53                  | 40 | 23            | 9  |

Таблица 1. Продолжение

| Вид  | 2009–2011, 2013 гг. |    | 2009–2010 гг. |    |
|--|---------------------|----|---------------|----|
|  | ФЧ                  | Ч  | ФЦ            | Ц  |
| <i>Siphomonas fritschii</i> Pringheim, 1946                                | 16                  | 5  | 5             | 14 |
| <i>Stokesiella longipes</i> (Stokes, 1888) Lemmermann, 1910                | 4                   | 2  | —             | —  |
| <i>Spumella coronifera</i> Skuja, 1948                                     | 9                   | 5  | —             | 5  |
| <i>Spumella cylindrica</i> Skuja, 1956                                     | 11                  | 14 | 18            | 9  |
| <i>S. neglecta</i> Skuja, 1956   | 2                   | —  | —             | —  |
| <i>S. major</i> Skuja, 1956  | 4                   | 7  | —             | 5  |
| <i>S. (Monas) sochiabilis</i> (Meyer, 1897)                                | 4                   | 12 | —             | —  |
| <i>Spumella vivipara</i>   | 27                  | 26 | 23            | 14 |
| <i>Spumella</i> sp. 1  | 69                  | 74 | 50            | 55 |
| <i>Spumella</i> sp. 2  | 31                  | 37 | 41            | 14 |
| <i>Spumella</i> sp. 3  | 42                  | 30 | 18            | 41 |
| Histionidae Flavin and Nerad, 1993   |                     |    |               |    |
| <i>Reclinomonas americana</i> Flavin and Nerad, 1993                       | 22                  | 14 | —             | —  |
| Euglenida Bütschli, 1884, emend. Simpson, 1997                             |                     |    |               |    |
| <i>Entosiphon sulcatum</i> (Duj.) Stein, 1878                              | 16                  | 16 | 9             | 5  |
| <i>Petalomonas angusta</i> (Klebs) Lemmerman, 1910                         | —                   | 2  | —             | —  |
| <i>P. minuta</i> Hollande, 1942  | 2                   | 7  | 5             | 9  |
| <i>P. steini</i> Klebs, 1893   | 7                   | 9  | 9             | 5  |
| <i>P. pusilla</i> Skuja, 1948  | 50                  | 52 | 32            | 23 |
| <i>Petalomonas</i> sp.   | 4                   | —  | —             | —  |
| <i>Pseudoperanema fusiforme</i> (Larsen, 1987) Larsen and Patterson, 1990  | 9                   | 7  | —             | —  |
| <i>Ploeotia discoides</i> Larsen and Patterson, 1990                       | 33                  | 12 | 9             | —  |
| Kinetoplastea Honigberg, 1963  |                     |    |               |    |
| <i>Bodo curvifilus</i> Griessmann, 1913                                    | 4                   | 7  | 23            | 23 |
| <i>B. designis</i> Skuja, 1948   | 73                  | 70 | 73            | 64 |
| <i>B. edax</i> Klebs, 1893   | 2                   | 5  | —             | —  |
| <i>B. globosus</i> Stein, 1878   | —                   | 2  | —             | —  |
| <i>B. minimus</i> Klebs, 1893  | 13                  | 14 | 9             | 9  |
| <i>B. repens</i> Klebs, 1893   | 4                   | 2  | 9             | 14 |
| <i>B. rostratus</i> (Kent) Klebs, 1893                                     | 2                   | 9  | 5             | 5  |
| <i>B. saltans</i> Ehrenberg, 1832  | 31                  | 26 | 32            | 27 |
| <i>B. saliens</i> Larsen et Patterson, 1990                                | 4                   | 7  | 9             | 5  |
| <i>B. spora</i> Skuja, 1956  | 4                   | 5  | 5             | —  |
| <i>Rhynchomonas nasuta</i> (Stokes, 1888) Klebs, 1892                      | 31                  | 53 | 55            | 36 |
| <i>Parabodo nitrophilus</i> Skuja, 1948                                    | —                   | —  | 9             | —  |
| <i>Phyllomitus apiculatus</i> Skuja, 1948                                  | 44                  | 44 | —             | 23 |
| Cryptophyceae Pascher, 1913  |                     |    |               |    |
| <i>Goniomonas truncata</i> (Fresenius) Stein, 1887                         | 62                  | 60 | 41            | 32 |
| Cercomonadida (Poche, 1913), emend. Vickerman, 1983, emend. Mylnikov, 1986 |                     |    |               |    |
| <i>Allantion tachyploon</i> Sandon, 1924                                   | 18                  | 12 | —             | —  |
| <i>Cercomonas amoibinus</i> Mylnikov, 1985                                 | 2                   | —  | —             | —  |
| <i>C. crassicauda</i> Dujardin, 1841                                       | 13                  | 9  | 5             | 5  |
| <i>C. granulifera</i> Hollande, 1942                                       | 7                   | 9  | 5             | —  |

Таблица 1. Окончание

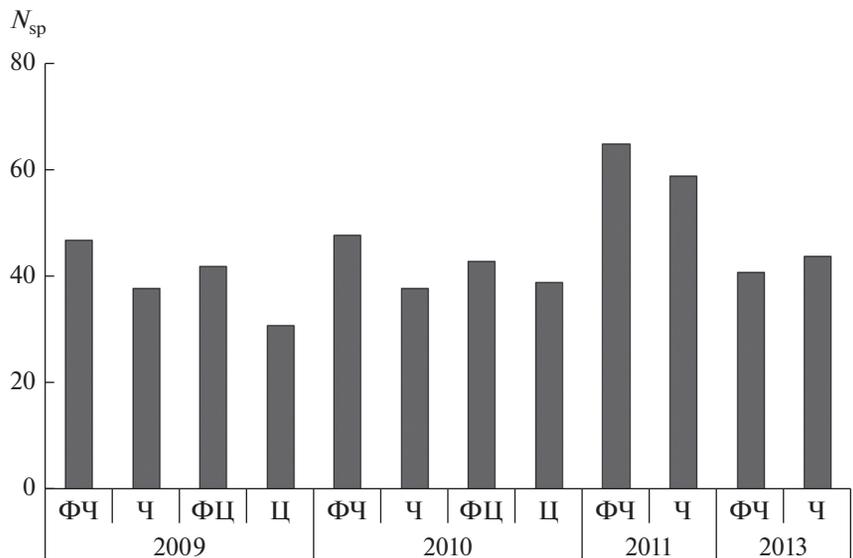
| Вид  | 2009–2011, 2013 гг. |    | 2009–2010 гг. |    |
|--|---------------------|----|---------------|----|
|  | ФЧ                  | Ч  | ФЦ            | Ц  |
| <i>C. levis</i> Skuja, 1939                                  | 2                   | —  | —             | —  |
| <i>C. longicauda</i> Dujardin, 1841                          | 27                  | 19 | 9             | 9  |
| <i>C. minimus</i> Mylnikov, 1992                             | 2                   | —  | —             | 14 |
| <i>Cercomonas</i> sp.1                                       | 7                   | 7  | 5             | 9  |
| <i>Cercomonas</i> sp.2                                       | 4                   | 2  | —             | —  |
| <i>Heteromita minima</i> (Hollande, 1942), Mylnikov, 2000    | 20                  | 19 | 23            | 9  |
| <i>H. reniformis</i> (Zhukov, 1978) Mylnikov et Karpov, 2004 | 33                  | 30 | 18            | 5  |
| <i>Helkesimastix faccicola</i> Woodcock et Lapage, 1914      | —                   | 2  | —             | —  |
| <i>Protaspis gemmifera</i> Larsen and Patterson, 1990        | 13                  | 19 | —             | 5  |
| <i>P. simplex</i> Vørs, 1992                                 | 18                  | 21 | 9             | —  |
| Silicofilosea Adl et al., 2005                               |                     |    |               |    |
| <i>Thaumatomonas lauterborni</i> De Saedeleer, 1931          | 2                   | —  | 5             | 5  |
| Dictyochophyceae Silva, 1980                                 |                     |    |               |    |
| <i>Actinomonas mirabilis</i> Kent, 1880                      | 7                   | 5  | 5             | 5  |
| <i>Pteridomonas pulex</i> Penard, 1890                       | 4                   | 12 | —             | —  |
| Colpodellida Cavalier-Smith, 1993, emend. Adl et al., 2005   |                     |    |               |    |
| <i>Colpodella angusta</i> (Duj.) Simpson et Patterson, 1996  | 4                   | 2  | 23            | 5  |
| Spongomonadida (Hibberd, 1983), emend. Karpov, 1990          |                     |    |               |    |
| <i>Spongomonas uvella</i> Stein, 1878                        | 4                   | —  | 9             | —  |
| Protista incertae sedis                                      |                     |    |               |    |
| <i>Ancyromonas contorta</i> (Klebs) Lemmermann, 1910         | 13                  | 2  | —             | 5  |
| <i>A. sigmoides</i> Kent, 1880                               | 49                  | 42 | 50            | 36 |
| <i>Amastigomonas debriney</i> De Saedeleer, 1931             | 2                   | 2  | 9             | —  |
| <i>A. caudata</i> Zhukov, 1975                               | 2                   | —  | —             | —  |
| <i>Aulacomonas hyalina</i> Skuja, 1956                       | 7                   | 2  | 9             | 5  |
| <i>Colponema loxodes</i> Stein, 1878                         | 13                  | 9  | —             | —  |
| <i>Metromonas</i> sp.  | —                   | —  | —             | 5  |
| <i>Katablepharis</i> sp.                                     | 24                  | 12 | 18            | 23 |
| Всего видов: 105   | 81                  | 77 | 53            | 48 |

крытой литорали встречалось представителей биозоеид.

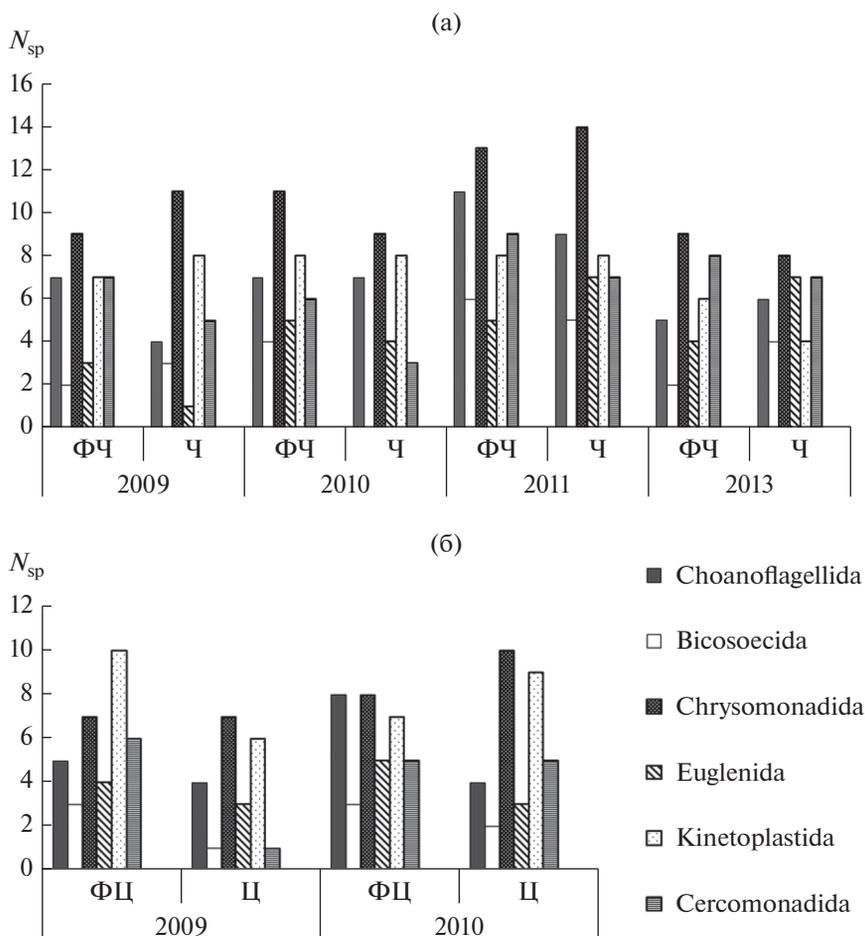
Число видов ГНФ в литорали водохранилища испытывало резкие сезонные колебания. Амплитуды сезонных изменений этого показателя обычно имели сходный характер на всех исследованных биотопах. Как правило, за пиком числа видов шел его резкий спад (рис. 3). На ст. ФЧ в 2009 г. обнаруживалось от 1 до 21 вида ГНФ (в среднем за сезон 9.6 видов), максимальные значения регистрировались в конце мая, в конце июня и в первой декаде августа. На ст. Ч число видов изменялось в пределах 2–22, а в среднем, за сезон составило 9.4. Здесь наблюдался только один ярко выраженный пик числа видов (в конце июня) (рис. 3а). Минимальное количество видов на обоих биото-

пах было в конце августа. В 2010 г. на станциях ФЧ и Ч число видов ГНФ изменялось от 5 до 19 (в среднем, за сезон 9.9) и от 4 до 16 (в среднем, 7.7) соответственно. Увеличение числа видов ГНФ на ст. Ч отмечалось в конце мая и в середине августа, а на ст. ФЧ — в середине июня. Меньше всего ГНФ на этих участках закрытой литорали регистрировалось в начале (ст. Ч) и в конце июня (ст. ФЧ) (рис. 3б).

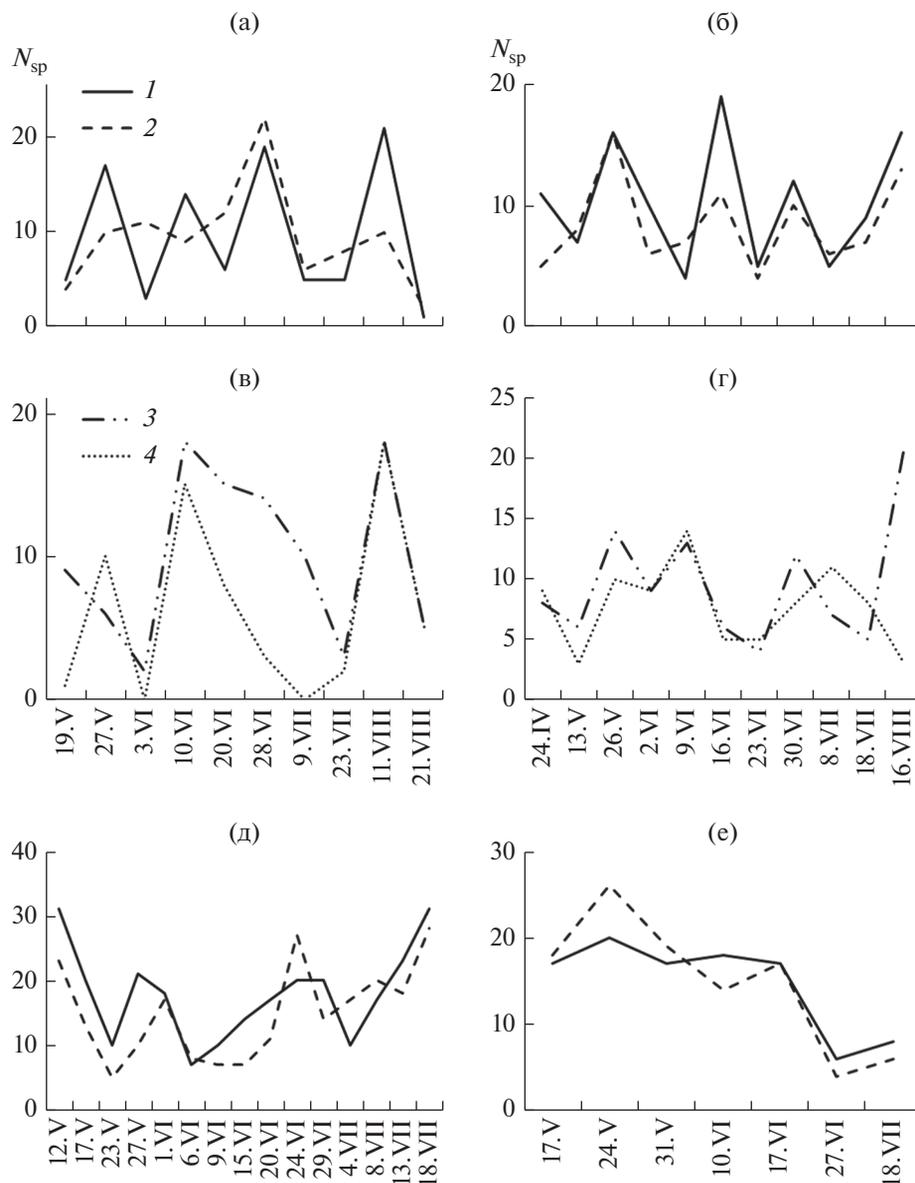
На станциях ФЦ и Ц открытой литорали в 2009 г. среднее за сезон число видов ГНФ составляло 10 и 6 соответственно. Максимум видов ГНФ регистрировался на фоновой станции в первой декаде июня, а также на обоих участках в начале августа. Меньше всего видов было в начале июня, а на ст. Ц еще и в начале июля (рис. 3в). В 2010 г. в среднем



**Рис. 1.** Число видов ГНФ ( $N_{sp}$ ) в защищенной зарастающей литорали Рыбинского водохранилища на заселенном чайками и крачками (ст. Ч) и фоновом (ст. ФЧ) участках и в открытой литорали вблизи колониальных поселений цапель (ст. Ц) и на фоновом участке (ст. ФЦ) в 2009, 2010, 2011 и 2013 гг.



**Рис. 2.** Таксономическая структура сообществ ГНФ на станциях Ч и ФЧ (а) и станциях Ц и ФЦ (б) в разные годы проведения исследований.



**Рис. 3.** Число видов ГНФ в 2009 (а, в), 2010 (б, г), 2011 (д) и 2013 (е) гг. на разных участках литорали водохранилища: 1 – ст. ФЧ, 2 – ст. Ч, 3 – ст. ФЦ, 4 – ст. Ц.

за сезон обнаруживалось 8 (на ст. Ц) и 10 (на ст. ФЦ) видов ГНФ. Наибольшее число видов на ст. ФЦ регистрировалось в середине августа, а на ст. Ц – в начале июня. Меньше всего видов ГНФ на ст. ФЦ было в начале третьей декады июня, а на ст. Ц в середине мая и августа (рис. 3г).

В 2011 и 2013 гг. в закрытой литорали отмечаются наиболее высокий уровень альфа-разнообразия: на станциях ФЧ и Ч, в среднем, за сезон обнаруживалось 17 и 15 видов соответственно. Число видов ГНФ было максимальным в середине мая и в середине августа, а минимальным – в начале июня (рис. 3д). В 2013 г. наблюдались отличия в сезонной динамике числа видов, а имен-

но: увеличение числа видов в конце мая и дальнейшее их постепенное снижение (рис. 3е).

Для понимания видового разнообразия сообществ ГНФ участков литорали проведен анализ их бета-разнообразия. Считается, что чем меньше общих видов в сообществах, тем этот показатель выше (Уиттекер, 1980). Бета-разнообразие сообществ ГНФ фоновых участков было сравнительно высоким в 2009 и 2010 гг. и низким – в 2011 и 2013 гг. (рис. 4а). В биотопах, заселенных птицами, сообщества ГНФ отличалось большим постоянством. Бета-разнообразие сообщества на ст. Ц было выше, чем на ст. ФЦ, что свидетельствует о

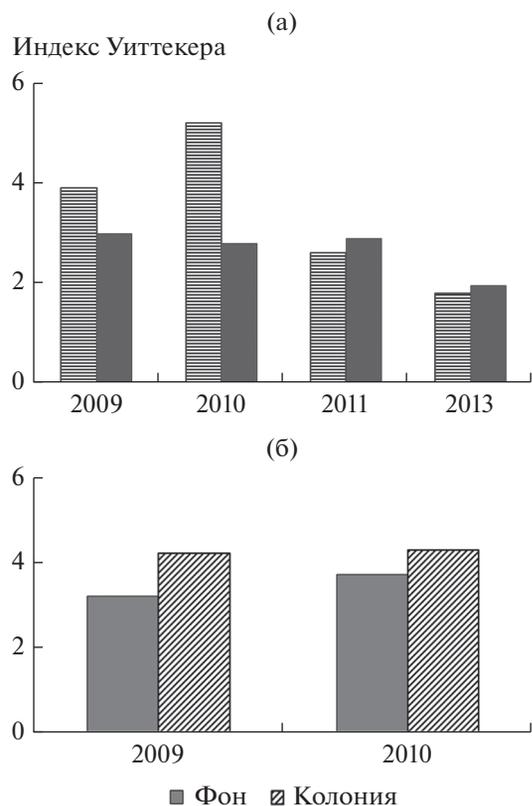


Рис. 4. Бета-разнообразие сообществ ГНФ на станциях Ч и ФЧ (а), Ц и ФЦ (б).

меньшей гетерогенности сообщества на участке вблизи колонии цапель (рис 4б).

Анализ распределения видов ГНФ по частоте встречаемости показал, что постоянные виды ( $P \geq 50\%$ ) составляли меньшую часть (3–22%) общего числа видов во всех литоральных биотопах (рис. 5). Основу разнообразия сообществ ГНФ определяли редкие виды ( $P \leq 20\%$ ), на долю которых приходилось более половины видов. В 2013 г. в закрытой литорали, особенно вблизи колонии чаек, наблюдалось снижение доли редких видов и увеличение доли постоянных видов.

Для определения сходства сообществ ГНФ разных участков литорали водохранилища использовали диаграммы Венна. В 2009 г. общими для всех четырех биотопов были 18 видов, что составляло 28% общего числа видов, в 2010 г. сходство сообществ было выше: общими были 35% видов (рис 6а и 6б). В 2009 г. сообщества ГНФ фоновых участков были более сходными (65%) по сравнению с сообществами участков, заселенных птицами (43%). В 2010 г., сходство сообществ между ст. Ц и ФЦ составляло 69%, а между ст. Ч и ФЧ — 51%. В 2011 и 2013 гг. сходство между сообществами фоновых и заселенными птицами участков оказалось равным 66% и 60% общего числа видов соответственно (рис.6в, г). В 2009 и 2010 гг. сход-

ство сообществ было выше на фоновых (65 и 43% соответственно), чем заселенных птицами участках (58 и 52% соответственно).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сообщества ГНФ разных водных местообитаний при некоторой степени структурной общности, которую определяют эврибионтные виды, имеют существенные отличия. Пока до конца не выяснено, какие факторы являются определяющими при формировании тех или иных типов сообществ ГНФ, какие изменения их структурной организации происходят при изменении условий окружающей среды. Известно, что для каждого пресного водоема характерен определенный комплекс видов ГНФ, отражающий его тип, уровень трофии, степень и характер загрязнения и др. Богаче всего фауна ГНФ мезосапробных водоемов. В олигосапробных водоемах доминируют прикрепленные одноклеточные формы: фильтраторы или седиментаторы (роды *Salpingoeca*, *Bicosoecida*). Мезосапробные водоемы характеризуются массовым развитием неприкрепленных жгутиконосцев, питающихся путем активной охоты (бодониды, бесцветные эвглениды), однако максимальной плотности здесь достигают прикрепленные колониальные организмы (род *Codonosiga*). В полисапробных водах доминируют неприкрепленные формы (Золотарев, 1987).

Большинство ГНФ из отрядов Chrysomonadida и Kinetoplastida является эврибионтными и повсеместно распространено в пресных водоемах (Mathes, Arndt, 1994; Arndt *et al.*, 2000; Auer, Arndt, 2001; Weitere, Arndt, 2003; Косолапова, 2005). Содоминантами могут быть хоанофлагелляты, бикозоециды, эвглениды и катаблефариды. В литорали Рыбинского водохранилища лидирующей группой в сообществе ГНФ были воротничковые жгутиконосцы (хоанофлагелляты), тогда как эвглениды не достигали значительного развития. С другой стороны, нами обнаружено значительное разнообразие церкомонад и бикозоецид, которые, однако, в сообществах исследованных биотопов в большинстве случаев были редкими представителями.

При эвтрофировании водоемов могут исчезать некоторые виды ГНФ. Вероятно, этим можно объяснить меньшее число видов ГНФ на участках литорали Рыбинского водохранилища, испытывающих влияние колониальных поселений птиц. Ранее в результате исследования малой реки, впадающей в Рыбинское водохранилище, было установлено, что на ее участках, испытывающих антропогенное (сточные воды сырзавода) и зоогенное (жизнедеятельность бобров) влияние, видовое богатство ГНФ было ниже, чем на быстротекущих и медленно текущих, зарастающих макрофитами участках (Косолапова, 2002). В работах А.В. Крылова с соавт. (Кры-

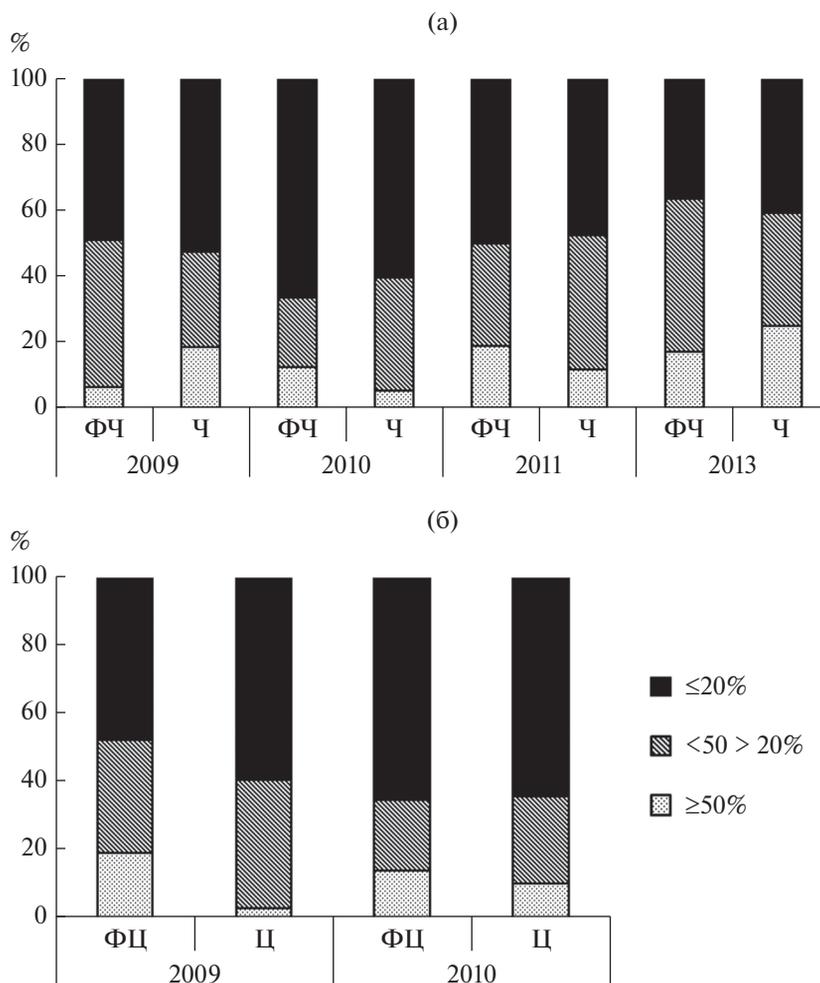


Рис. 5. Распределение видов ГНФ по частоте их встречаемости на станциях Ч и ФЧ (а), Ц и ФЦ (б).

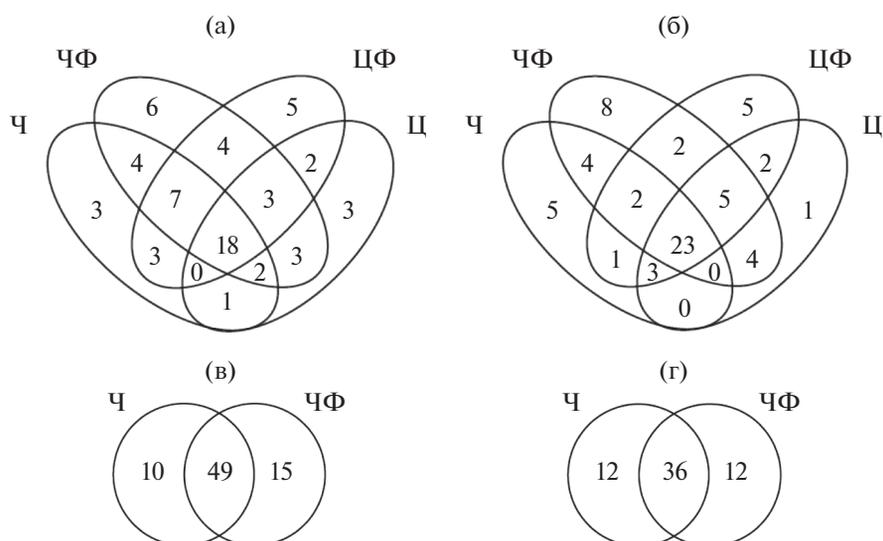


Рис. 6. Диаграммы Венна биоценологического сходства литоральных сообществ ГНФ в 2009 (а), 2010 (б), 2011 (в) и 2013 (г).

лов и др., 2012) было также показано уменьшение видового богатства и числа доминирующих видов зоопланктона в местах колониальных поселений птиц, вызванное поступлением больших количеств органических веществ и соединений биогенных элементов в результате жизнедеятельности птиц. По нашим данным, в литорали Рыбинского водохранилища значения БПК<sub>5</sub>, отражающие содержание в воде легкоокисляемых органических веществ, в местах колониальных поселений птиц были, в среднем, в 3 раза выше, чем на фоновых участках.

В литорали по сравнению с пелагиалью Рыбинского водохранилища, нами было обнаружено большее число видов ГНФ. Исследования, проведенные в глубоководной части водохранилища в 2007–2009 гг., выявили 73 вида и формы ГНФ из 12 крупных таксонов и группы неопределенного систематического положения (Косолапова, 2018). Основу разнообразия пелагиальных сообществ составляли представители Kinetoplastida, Cercomonadida, Chryomonadida и Choanomonada. В прибрежно-мелководной зоне обнаружено 39 видов, которые не встречались в глубоководной части водохранилища, и только 6 видов, идентифицированных в пелагиали, не были отмечены в литорали.

Доминирующий комплекс сообществ ГНФ в литорали водохранилища состоял из 19 видов. Это *Codonosiga botritis*, *Monosiga ovata*, *Bicosiella lacustris*, *Anthophysa vegetans*, *Spumella* sp. 1, *S.* sp. 2, *S.* sp. 3, *Paraphisomonas imperforata*, *P. vestita*, *B. designis*, *Bodo saltans*, *Rhynchomonas nasuta*, *Phyllomitus apiculatus*, *Petalomonas pusilla*, *Goniomonas truncata*, *A. sigmoides*, *Reclinomonas americana*, *Protaspis simplex* и *Heteromita reniformis*. Большинство этих видов обладает широкой экологической валентностью, и населяет разнотипные водоемы с большим диапазоном варьирования экологических факторов.

Интересно отметить, что некоторые виды ГНФ постоянно встречались только в прибрежных мелководьях, не испытывающих влияние жизнедеятельности колониальных птиц, — это *M. ovata*, *B. lacustris*, *B. saltans* и *H. reniformis*. На участках, заселенных птицами, только два вида флаголлят (*A. vegetans* и *P. simplex*) имели высокую частоту встречаемости. *B. designis* постоянно регистрировался во всех литоральных биотопах все четыре года исследований.

Десять видов, обнаруженных в прибрежных мелководьях водохранилища (*Actinomonas mirabilis*, *Ancyromonas sigmoides*, *Amastigomonas debriney*, *B. designis*, *B. saltans*, *Bodo saliens*, *Cafeteria roenbergensis*, *P. pusilla*, *Petalomonas minuta* и *Rh.s nasuta*) входят в число 20 наиболее часто встречающихся в мировой фауне ГНФ (Patterson, Lee, 2000).

Большую часть сообщества ГНФ литорали водохранилища составляли редкие виды ( $P \leq 20\%$ ),

которые, как правило, и определяли различия видового состава между биотопами. Эта закономерность наблюдается в большинстве водоемов и водотоков (Косолапова, 2002, 2005).

Характер сезонных колебаний числа видов ГНФ на разных участках прибрежных мелководий водохранилища имел свои особенности, причем влияние на него колониальных поселений птиц проявлялось слабо. Практически на всех участках наблюдалось 4 основных пика числа видов ГНФ: в конце мая, в середине июня, в конце июня и в середине августа. Исключением был 2013 г., когда в защищенной литорали регистрировался один пик в конце мая, и в дальнейшем происходило постепенное снижение числа видов. Вероятно, это связано с тем, что в 2013 г. наблюдались резкие колебания уровня воды водохранилища. В этот год в защищенной литорали птицы не смогли сформировать гнездовую колонию высокой плотности, как в предыдущие годы, поэтому их влияние на ГНФ было менее выражено.

Важными факторами, определяющими развитие ГНФ в пресных водоемах, являются уровень количество, активность и структура сообщества их основных пищевых объектов — бактерий, а также их основных консументов: инфузорий и многоклеточного зоопланктона (Arndt *et al.*, 2000; Auer, Arndt, 2001). В водохранилищах, особенно в их литоральной зоне, на структурно-функциональную организацию сообществ гидробионтов решающее влияние оказывает уровневый режим, регулируемый человеком. Взаимодействие всех этих и других факторов объясняет высокую вариабельность численности, биомассы (Румянцева и др., 2016), а также числа видов ГНФ в литорали Рыбинского водохранилища в течение вегетационного сезона (с мая до обмеления и пересыхания прибрежно-мелководных участков в августе). При этом состав таксонов высокого ранга, особенно доминирующих, оставался сравнительно постоянным.

\*\*\*

Таким образом, в литорали Рыбинского водохранилища идентифицировано 105 видов и форм ГНФ из 13 крупных таксонов и группы неопределенного систематического положения. Фауна ГНФ в литоральной зоне водохранилища представлена большим числом видов, чем в пелагиали. По видовому богатству доминировали хоанофлаголляты и хризофитовые. В прибрежных мелководьях, заселенных колониальными птицами, число видов ГНФ было обычно ниже, чем в фоновых биотопах. Большинство часто встречающихся в литорали водохранилища видов относится к эврибионтам. В литорали водохранилища обнаружено 10 видов, входящих в состав 20 наиболее часто встречающихся видов в мировой фауне ГНФ. Основу раз-

нообразия литоральных сообществ ГНФ составляли редкие виды, которые чаще всего и определяли различие между биотопами.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания (№ темы АААА-А18-118012690098-5).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Буторин Н.В.* Значение мелководий в биологической продуктивности водохранилищ / *Н.В. Буторин, С.М. Успенский* // Биологические ресурсы водохранилищ. М.: Наука, 1984. С. 23–41.
- Ветрова З.И.* Бесцветные эвгленовые водоросли Украины // Киев: Наукова Думка, 1980. 184 с.
- Жуков Б.Ф.* Бесцветные жгутиконосцы в планктоне некоторых волжских водохранилищ // Биол. внутр. вод: Информ. бюл. Л., 1989. № 83. С. 28–31.
- Жуков Б.Ф.* Атлас пресноводных гетеротрофных жгутиконосцев (биология, экология и систематика). Рыбинск: Ин-т биологии внутр. вод, 1993. 160 с.
- Жуков Б.Ф.* Гетеротрофные жгутиконосцы // Экологические проблемы Верхней Волги: Коллективная монография. Ярославль: Изд-во ЯГТУ, 2001. С. 117–120.
- Золотарев В.А.* Простейшие водоемов различной сапробности. // Фауна и биология пресноводных организмов. Л.: Наука, 1987. С. 108–119.
- Косолапова Н.Г.* Фауна гетеротрофных жгутиконосцев малой реки Латка // Биол. внутр. вод. 2002. № 4. С. 14–18.
- Косолапова Н.Г.* Сообщества планктонных гетеротрофных жгутиконосцев в малых водных объектах Автореф. дис. канд. биол. наук. Борок, 2005. 24 с.
- Косолапова Н.Г.* Гетеротрофные жгутиконосцы в планктоне водохранилища // Структура и функционирование экосистемы Рыбинского водохранилища в начале XXI в. / ред. В.И. Лазарева. М.: РАН, 2018. С. 208–2012.
- Крылов А.В., Кулаков Д.В., Чалова И.В., Папченков В.Г.* Зоопланктон пресных водоемов в условиях влияния гидрофильных птиц // Ижевск: Издатель Пермьяков С.А., 2012. 204 с.
- Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов. М.: Наука, 1975. 240 с.
- Румянцева Е.В., Косолапов Д.Б., Косолапова Н.Г., Кулаков Д.В.* Динамика планктонных микроорганизмов и вирусов в литорали Рыбинского водохранилища: влияние колониальных поселений птиц // Биол. внутр. вод. 2013. № 4. С. 21–29
- Румянцева Е.В., Косолапов Д.Б., Косолапова Н.Г., Леванова Ю.В.* Бактериопланктон Рыбинского водохранилища в зоне колониальных поселений птиц сем. Чайковых (Laridae) // Биол. внутр. вод. 2015. № 2. С. 39–49
- Румянцева Е.В., Косолапова Н.Г., Косолапов Д.Б.* Взаимоотношения бактериопланктона, гетеротрофных нанофлагеллят и вириопланктона в литорали крупного равнинного водохранилища: влияние колониальных птиц // Микробиология. 2016. Т. 85. № 5. С. 588–597
- Рыбинское водохранилище и его жизнь. Л.: Изд-во “Наука”, 1972. 364 с.
- Умткер П.* Сообщества и экосистемы. М.: Изд-во Прогресс, 1980. 328 с.
- Arndt H., Dietrich D., Auer B., Cleven E.-J., Grafenhan T., Wietere M., Mylnikov A.* Functional diversity of heterotrophic flagellates in aquatic ecosystems // The flagellates: Unity, diversity and evolution. (Eds: *Leadbeater B.S.C.; Green J.C.*). London and N.Y.: Taylor and Francis, 2000. P. 240–268.
- Auer B., Arndt H.* Taxonomic composition and biomass of heterotrophic flagellates in relation to lake trophy and season // *Freshwater Biol.* 2001. V. 46. P. 959–972.
- Auer B., Elzer U., Arndt H.* Comparison of pelagic food webs in lakes along a trophic gradient and with seasonal aspects: influence of resource and predation // *J. Plankton Res.* 2004. V. 26. № 6. P. 697–709.
- Azam F., Fenchel T., Field J.G., Gray J.S., Meyer-Reil L.A., Thingstad T.F.* The ecological role of water-column microbes in the sea // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1983. V. 10. P. 257–263.
- Laybourn-Parry J., Parry J.* Flagellates and the microbial loop // *The Systematics Association Special Volume Series 59. The Flagellates, Unity, Diversity and Evolution.* London, N.Y.: Taylor & Francis, 2000. P. 216–239.
- Lee W.* Small free-living heterotrophic flagellates from marine sediments of Gippsland Basin, South-Eastern Australia // *Acta Protozool.* 2015. V. 54. P. 53–76.
- Lee W., Patterson D.* Heterotrophic flagellates (Protista) from marine sediments of Botany Bay // *Austr. J. Nat. History.* 2000. V. 34. P. 483–562.
- Mathes J., Arndt H.* Biomass and composition of protozooplankton in relation to lake trophy in North German lakes // *Mar. Microb. Food Webs.* 1994. V. 4. P. 357–375.
- Patterson D.J., Lee W.J.* Geographic distribution and diversity of free-living heterotrophic flagellates // *The flagellates: Unity, diversity and evolution.* (Eds: *Leadbeater B.S.C.; Green J.C.*). London and N.Y.: Taylor and Francis, 2000. P. 259–287.
- Pomeroy L.* The ocean’s food web, a changing paradigm // *BioScience.* 1974. V. 24. P. 499–504.
- Sherr E.B., Sherr B.F.* Role of microbes in pelagic food webs: a revised concept // *Limnol. Oceanogr.* 1988. V. 33. P. 1225–1226.
- Tikhonenkov D.V., Mylnikov A.P., Gong Y.C., Feng W.S., Mazei Y.* Heterotrophic Flagellates from Freshwater and Soil Habitats in Subtropical China (Wuhan Area, Hubei Province) // *Acta Protozool.* 2012. V. 51. P. 63–77.
- Vørs N.* Heterotrophic amoebae, flagellates and Heliozoa from the Tvarminne Area, Gulf of Finland, in 1988–1990 // *Ophelia.* 1992. V. 36. № 1. P. 1–109.
- Weitere M., Arndt H.* Structure of the heterotrophic flagellate community in the water column of the River Rhine (Germany) // *Eur. J. Protistol.* 2003. V. 39. P. 287–300.
- Weisse T.* The significance of inter- and intraspecific variation in bacterivorous and herbivorous protists // *Antonie van Leeuwenhoek.* 2002. V. 81. P. 327–341.

## Diversity and Community Dynamics of Heterotrophic Flagellates in the Littoral of a Large Plain Reservoir

N. G. Kosolapova<sup>1, #</sup>, E. V. Kuznetsova<sup>1</sup>, and D. B. Kosolapov<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Papanin Institute for Biology of Inland Waters of RAS, pos. Borok, 109, Nekouz r-n, Yaroslavl obl., 152742 Russia

<sup>2</sup> Cherepovets State University, prosp. Lunacharskogo, 5, Cherepovets, Vologodskaya obl., 162600 Russia

<sup>#</sup>e-mail: kng@ibw.ru

The species composition and community structure of planktonic heterotrophic nanoflagellates (HNF) were studied for 4 years in the spring-summer period in the different types of littoral waters of the Rybinsk Reservoir (Upper Volga), incl. on sites, influenced by the vital activity of colonial birds. 105 species and forms of HNF from 13 large taxa and a group of uncertain taxonomic position were identified. The taxa Choanoflagellida and Chrysomonadida were represented by the largest number of species in all littoral zones studied. Fewer species of HNF were recorded in the littoral zone affected by colonial bird settlements than in areas not affected. The maximum number of species (81) was recorded in the protected overgrown littoral zone, the minimum (48 species) – in the open littoral zone near the heron colony. 35 species were common for the all littoral sites. Among them, 3 species (*Bodo designis*, *Paraphysomonas imperforata* and *Spumella* sp. 1) had a high frequency of occurrence ( $\geq 50\%$ ). However, the species, the frequency of which was  $\leq 20\%$ , were the basis for the diversity of HNF. They made up more than a half of the species list in all biotopes. The dominant complex of littoral communities of the reservoir was represented by 19 species.

**Keywords:** heterotrophic flagellates, species diversity, community structure, Rybinsk reservoir, littoral zone, bird colonies

УДК 591.111.1.597.556.334.1.597.556.21

## О ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ТРЕХ ВИДОВ РЫБ С РАЗНОЙ ЭКОЛОГИЕЙ (*Scombridae* и *Berycidae*)

© 2022 г. А. И. Никитенко\*, @, Г. И. Пронина\*\*, \*\*\*,  
 А. М. Орлов\*\*\*\*, \*\*\*\*\*, \*\*\*\*\*, \*\*\*\*\*, \*\*\*\*\*, \*\*\*\*\*, \*\*\*\*\*, Д. В. Артеменков\*\*\*\*,  
 А. Н. Строганов\*\*\*\*\*, В. А. Беляев\*\*\*\*

\*Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ ВНИРО, пос. Рыбное, Дмитровский р-н,  
 Московская область, 141821 Россия

\*\*ВНИИ ирригационного рыбоводства, пос. Воровского, Ногинский р-н, Московская обл., 142460 Россия

\*\*\*Российский государственный аграрный университет – МСА им. акад. К.А. Тимирязева,  
 ул. Тимирязевская 49, Москва, 127550 Россия

\*\*\*\*ВНИИ рыбного хозяйства и океанографии, Окружной проезд 19, Москва, 105187 Россия

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

\*\*\*\*\*Дагестанский государственный университет, ул. Гаджиева 43а, Махачкала, 367000 Россия

\*\*\*\*\*Прикаспийский институт биологических ресурсов ДНЦ РАН, ул. Гаджиева 45, Махачкала, 367000 Россия

\*\*\*\*\*Томский государственный университет, просп. Ленина 36, Томск, 634050 Россия

\*\*\*\*\*Институт океанологии им. П.П. Шишова РАН, Нахимовский просп. 36, Москва, 117218 Россия

\*\*\*\*\*Московский государственный университет имю М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

@E-mail: alexey\_nikitenko90@mail.ru

Поступила в редакцию 14.05.2021 г.

После доработки 08.06.2021 г.

Принята к публикации 10.06.2021 г.

На основании материалов научного мониторинга на промысловых судах в акватории исключительных экономических зон Марокко и Мавритании в 2004–2017 гг. впервые представлены гематологические параметры периферической крови скумбрии *Scomber colias*, пелаמידы *Sarda sarda* и берикса *Beryx splendens*. При описании клеток эритропоэтического ряда отмечен факт большего количества незрелых клеток у берикса, что, вероятно, связано с его пищевыми вертикальными миграциями на большие глубины с высоким давлением и пониженным содержанием кислорода. Анализ эритропоэза и лейкоцитарной формулы рыб позволил выявить особенности физиологического и иммунологического характера. Так, у пелаמידы отмечено более высокое содержание моноцитов, чем у скумбрии и берикса, что свидетельствует о высоком уровне врожденного клеточного иммунитета, представленного фагоцитозом.

**Ключевые слова:** скумбрия *Scomber colias*, пеламида *Sarda sarda*, берикс *Beryx splendens*, эритропоэз, лейкоцитарная формула

**DOI:** 10.31857/S1026347022060117

Кровь является информативным индикатором состояния организма рыб, отражающим влияние физико-химических факторов среды, сезона и экологии вида, как для отдельно взятой особи, так для популяций в целом (Головина, Тромбицкий, 1989; Камышников, 2004). В условиях различных экологических зон Мирового океана особую актуальность приобретают исследования закономерностей физиологических адаптаций рыб к изменяющимся внешним факторам. Клетки эритропоэтического ряда и лейкоцитов выполняют разнообразные физиологические и иммунологические функции, защищают организм от чужеродных тел и обеспечивают адаптацию рыб к из-

меняющимся внешним факторам (Микряков, Балабанова, 1979; Secombes, 1996; Галактионов, 2005). Особенности вида и среды обитания отражаются на составе эритроцитов и лейкоцитов рыб, основными типами которых являются зрелые и базофильные эритроциты, нормобласты, а также лимфоциты, моноциты, нейтро-, эозино- и базофилы и небольшая доля незрелых форм лейкоцитов. Соотношение отдельных типов клеток может свидетельствовать о физиологическом состоянии (или статусе) рыб и наличии биотических и абиотических стресс-факторов (Иванова, 1983; Parish *et al.*, 1986; Головина, Тромбицкий, 1989; Жите-

нева и др., 1989; Точилина, 1994; Микряков и др., 2001).

Достаточно много исследований посвящено изучению клеточного состава крови рыб, обитающих в пресноводных и солоноватоводных экосистемах (Иванова, 1983; Головина, Тромбицкий, 1989; Точилина, 1994). Несмотря на свое широкое распространение и значительную численность в Мировом океане, скумбрия (*Scomber colias* Gmelin, 1789), пеламида (*Sarda sarda* Bloch, 1793) и берикс (*Beryx splendens* Lowe, 1834) обитают в различных экологических условиях и отличаются своеобразным пищевым поведением (Nielsen, 1979; Maul, 1990; Collette, 2003). Они давно привлекают внимание специалистов, которыми в большей степени исследованы процессы роста, особенности морфологии, физиологии, биохимии, химического состава тела и т.д. Однако к настоящему времени сведения об особенностях морфофизиологических перестроек форменных элементов крови в процессах адаптации к изменяющимся внешним факторам, отмеченных у трех видов рыб семейств скумбриевые Scombridae и бериковые Berycidae, в целом крайне малочисленны (Аmineва, Яржобек, 1984; Shimizu, 1984; Collette, 2003).

Скумбрия *S. colias*, пеламида *S. sarda* и берикс *B. splendens* — условно хищные и хищные рыбы средних и крупных размеров, обитающие в умеренных и субтропических водах. Первый вид является прибрежным пелагическим, поэтому встречается на глубинах от поверхности до 300 м, обычен в диапазоне глубин до 110 м. Ареал скумбрии расположен в теплых водах восточной части Атлантического океана и в Средиземном и Черном морях (Collette, Nauen 1983; Парин, 1988). Пеламида является исключительно эпипелагическим видом, встречается в диапазоне глубин до 200 м и иногда заходит в устья. Пеламида распространена преимущественно в восточной части Атлантического океана от Норвегии до Южной Африки, в том числе Средиземном и Черном морях, встречается в западной Атлантике от Канады до северной части Мексиканского залива, также зарегистрированы поимки у берегов Колумбии и Венесуэлы (Collette, 1986; Maigret, 1986). Последний вид распространен по всему миру в регионах континентального склона в Мексиканском заливе и на подводных горах в Атлантическом, Индийском и Тихом океанах, за исключением восточной и северной части Тихого океана. Берикс обычно обитает на глубинах от 150 до 800 м, встречается — от 10 до 1300 м (Heemstra, 1986; Paxton, 1999; Ramos *et al.*, 2001; Козлов, 2004; Moffitt *et al.*, 2004).

Цель данной работы — исследование гематологических параметров периферической крови трех видов рыб с различной экологией (*S. colias*, *S. sarda*, *B. splendens*) семейств скумбриевые (Scombridae)

и бериковые (Berycidae) в центрально-восточной части Атлантического океана.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Рыб отлавливали во время научного мониторинга на промысловых судах в акватории исключительных экономических зон Марокко и Мавритании между 16°0′–23°58′ с.ш., 16°25′–17°50′ з.д. в феврале–декабре 2004–2017 гг. на глубине от 35 до 270 м разноглубинным тралом типа Sirius 4, вертикальным раскрытием 55–80 м, горизонтальным — 140–160 м, канатная и сетная части которого изготовлены из современных облегченных материалов, размеры ячеи в крыльях 50–70 мм и кутце 16–24 мм. При проведении биологического анализа ежедневно из улова отбирали случайную пробу, в которой определяли и измеряли: длину рыб по Смитту, массу тела, пол, стадию зрелости гонад, балл наполнения желудков с указанием преобладающих объектов питания (Изучение экосистем ..., 2004). За весь период исследований обработано 7812 экз. трех видов рыб (*S. colias*, *S. sarda*, *B. splendens*).

Отобранные особи берикса в биоанализе имели размер от 11 до 27 см и массу от 26 до 544 г, что отличается от литературных данных, где отмечены особи достигшие размеров 70 см в Мексиканском заливе, 70 см в Атлантическом, 44 см в Индийском и 50 см в Тихом океанах, обычный размер составляет 40 см (Parin *et al.*, 1995; Lehodey, Grandperrin, 1996; Sommer *et al.*, 1996; Santamaria *et al.*, 2006). Пеламида может достигать длины 61 см в Средиземном море (Campro *et al.*, 2006; Zogica, 2008) и 91 см в Центрально-Восточной Атлантике, обычный размер — 50 см (Collette, Nauen 1983; Гушин, Кортен, 2016). Проанализированные экземпляры в период научного мониторинга — от 23 до 65 см; масса тела — от 250 до 3455 г. Особи скумбрии в биоанализе — от 12 до 46 см; масса от 123 до 1440 г, по литературным данным скумбрия может достигать 50 см, обычный размер составляет 30 см (Torres *et al.*, 2012; Гушин, Кортен, 2017).

Для проведения клинических исследований рыб в 2017 г. взяты 10 проб из уловов 4 тралений (скумбрия — 4 экз., пеламида — 3 экз., берикс — 3 экз., табл. 1). У свежельовленных рыб осуществляли взятие проб крови из хвостовой артерии. Сразу изготавливали препараты на предметных стеклах в 2-х повторностях на одну пробу. После изготовления мазки крови высушивали в темном проветриваемом месте до исчезновения влажного блеска. Высушенные мазки хранили при комнатной температуре, обернув мазки в бумагу, и транспортировали в лабораторию для анализа (Иванов и др., 2013).

Состав эритроцитов и лейкоцитов определяли в мазках периферической крови, окрашенных по

**Таблица 1.** Характеристика объектов исследования хищных рыб семейств Scombridae (скумбрии, пелаמידы) и Berycidae (берикса)

| Вид                    | Длина, см | Масса, г | Пол | Глубина, м | Стадия половозрелости | Степень наполнения желудка |
|------------------------|-----------|----------|-----|------------|-----------------------|----------------------------|
| <i>Scomber colias</i>  | 27.9      | 268      | m   | 50         | 2                     | 3                          |
|                        | 28.2      | 290      | m   | 50         | 2                     | 3                          |
|                        | 29.8      | 280      | f   | 50         | 2                     | 2                          |
|                        | 26.8      | 222      | f   | 100        | 2                     | 1                          |
| <i>Sarda sarda</i>     | 44.0      | 1190     | f   | 50         | 2                     | 0                          |
|                        | 44.5      | 1262     | f   | 50         | 2                     | 1                          |
|                        | 47.3      | 1578     | f   | 50         | 2                     | 1                          |
| <i>Beryx splendens</i> | 21.8      | 240      | f   | 50         | 4                     | 4                          |
|                        | 22.3      | 224      | m   | 50         | 3                     | 4                          |
|                        | 22.9      | 270      | m   | 50         | 2                     | 0                          |

Романовскому—Гимза (Иванов и др., 2013). В каждом мазке определяли содержание основных типов клеток подсчетом по методу Горяева под цифровым микроскопом Optika DM-15 (Польша) с увеличением  $10 \times 60$ , далее производили расчет относительного их количества от суммы всех клеток в эритропоэтическом ряду и в лейкоцитарной формуле. Результаты исследований обработаны статистически с использованием *t*-теста при уровне достоверности  $p \leq 0.05$  стандартным пакетом программ (Statistica v.12).

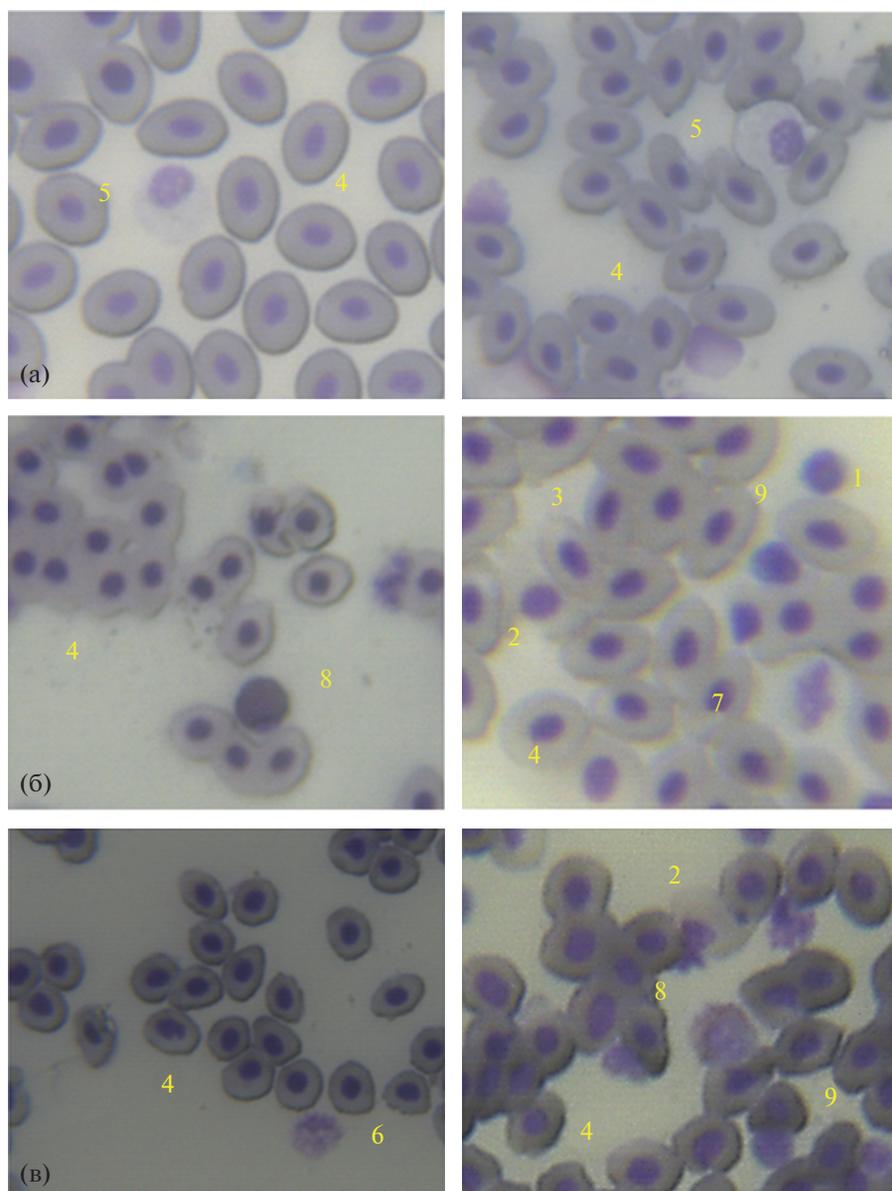
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Места обитания отмеченных видов рыб характеризуются различными экологическими условиями, в которых у рыб наблюдаются морфологические особенности и своеобразное пищевое поведение. Во время научного мониторинга в содержимом пищеварительного тракта скумбрии обнаружены мелкие пелагические виды рыб (ставриды, миктофиды), беспозвоночные (кальмары, креветки, копеподы, эвфаузииды, оболочники) и неидентифицированные переваренные остатки пищи. В исследованиях по питанию скумбрии дополнительно отмечены рыбы семейств анчусовые, сельдевые, веретенниковые, горбылёвые, некоторые беспозвоночные (мизиды, гиперииды, полихеты), фитопланктон и водоросли (Maigret, Lu 1986; Castro, 1993; Гушин, Кортен, 2017). Доля рыбы в составе пищи скумбрии в зависимости от сезона и района может составлять от 29 до 80%. По анализу полученных данных спектр питания пелаמידы состоит исключительно из рыб (сардинелла, ставрида и скумбрия). Но в других исследованиях в содержимом пищеварительного тракта регистрируются беспозвоночные (моллюски, копеподы и оболочники), в различных районах

обитания и сезонах в составе пищи пелаמידы встречаются анчоус, смарида, алоза, сардина, мейнола, каранкс (Collette, 2003; Campo *et al.*, 2006; Гушин, Кортен, 2016).

Состав пищи берикса в акватории Марокко и Мавритании представлен миктофидами и беспозвоночными (копеподы, эвфаузииды). Также в Центрально-Восточной Атлантике исследователи питания берикса фиксируют в их пищеварительном тракте рыб семейств гоностомовые и стомиевые, а также беспозвоночных (креветки, полихеты, кальмары) (Dudockin, Kotlyar 1989; Козлов, 2004; Heemstra, Heemstra 2004). В других регионах пища берикса не отличается и состоит преимущественно из ракообразных и мезопелагических рыб. Доля рыбы в составе пищи берикса в зависимости от сезона колеблется от 11 до 58% (Lehodey, Grandperrin, 1996; Durr, Gonzalez, 2002; Horn *et al.*, 2010; Kells, Carpenter, 2011). Особенности питания видов и их среды обитания отражаются на составе эритроцитов и лейкоцитов рыб, а соотношение отдельных типов клеток может характеризовать физиологическое состояние.

Морфология и размеры клеток эритропоэтического ряда у трех рассматриваемых видов (рис. 1) аналогична другим костистым видам рыб (Иванова, 1983; Головина, Тромбицкий, 1989). Среди типов клеток были отмечены гемоцитобласты и эритробласты (за исключением берикса), нормобласты, базофильные эритроциты и зрелые полихроматофильные эритроциты (табл. 2). На долю созревающих клеток изучаемых рыб приходилось 7.4–14.0%. Известно, что некоторое количество незрелых клеток циркулирует в периферической крови, так как у рыб отсутствует красный костный мозг и эритропоэз у них происходит в нескольких органах и тканях и завершается в со-



**Рис. 1.** Клетки крови скумбрии *Scomber colias* (а), пелагиды *Sarda sarda* (б) и берикса *Beryx splendens* (в). Масштаб: 50 мкм. Обозначения: 1 – эритробласты; 2 – нормобласты; 3 – базофильные эритроциты; 4 – зрелые и полихроматофильные эритроциты; 5 – миелоциты; 6 – метамиелоциты; 7 – палочкоядерные нейтрофилы; 8 – эозинофилы; 9 – лимфоциты.

судистой системе (Иванова, 1983; Головина, Тромбицкий, 1989).

У берикса примерно в два раза выше процент нормобластов чем у скумбрии и пелагиды за счет снижения зрелых эритроцитов, которые были самой многочисленной группой клеток у рыб. Тем не менее, у берикса в отличие от других изучаемых рыб, отсутствует в крови эритро- и гемоцитобласты.

По результатам исследований состава клеток эритроидного ряда следует отметить, что эритропоэз у трех исследованных видов семейств скум-

бриевые и бериковые различался (табл. 2). Факт большего количества незрелых клеток у берикса, вероятно, связан с возможными пищевыми вертикальными миграциями на большие глубины с высоким давлением и пониженным содержанием кислорода, поэтому у берикса эритропоэз происходит более интенсивно. Высокое содержание незрелых клеток эритропоидного ряда в отличие от скумбрии наблюдается у пелагиды, которая не испытывает больших перегрузок с высоким давлением, но являясь активным хищником в эпипелагической зоне может создавать риск пониженного содержания кислорода в тканях.

Таблица 2. Параметры периферической крови трех видов рыб семейств Scombridae и Berycidae

| Показатели                                    | Скумбрия<br>( <i>Scomber colias</i> ) | Пеламида<br>( <i>Sarda sarda</i> ) | Берикс<br>( <i>Beryx splendens</i> ) |
|---|---------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| Эритропоэз, %                                 |                                       |                                    |                                      |
| Гемоцитобласты, эритробласты                  | 0.1 ± 0.03                            | 0.3 ± 0.13                         | —                                    |
| Нормобласты                                   | <b>1.5 ± 0.50</b> <sup>СБ</sup>       | 2.0 ± 0.58                         | <b>4.0 ± 1.00</b> <sup>СБ</sup>      |
| Базофильные эритроциты                        | 5.8 ± 2.14                            | 9.7 ± 1.20                         | 10.0 ± 1.53                          |
| Сумма зрелых и полихроматофильных эритроцитов | <b>92.6 ± 2.48</b> <sup>СБ</sup>      | 88.0 ± 1.15                        | <b>86.0 ± 1.15</b> <sup>СБ</sup>     |
| Лейкоцитарная формула, %                      |                                       |                                    |                                      |
| Миелоциты                                     | 1.8 ± 0.63                            | 1.0 ± 0.50                         | 0.7 ± 0.67                           |
| Метамиелоциты                                 | <b>0.3 ± 0.25</b> <sup>СП</sup>       | <b>1.3 ± 0.33</b> <sup>СП</sup>    | 0.7 ± 0.33                           |
| Палочкоядерные нейтрофилы                     | 1.0 ± 0.50                            | 2.7 ± 1.20                         | 1.7 ± 0.88                           |
| Сегментоядерные                               | 1.0 ± 0.58                            | 4.7 ± 2.33                         | 1.7 ± 1.20                           |
| Эозинофилы                                    | 1.0 ± 0.50                            | 0.3 ± 0.13                         | 0.7 ± 0.33                           |
| Базофилы                                      | 0.5 ± 0.29                            | 0.3 ± 0.13                         | 1.3 ± 0.88                           |
| Моноциты                                      | <b>1.0 ± 0.41</b> <sup>СП</sup>       | <b>2.3 ± 0.33</b> <sup>СП</sup>    | 1.3 ± 0.67                           |
| Лимфоциты                                     | 93.5 ± 2.22                           | 87.3 ± 3.71                        | 92.0 ± 1.15                          |

Примечание. “—” — данные типы форменных элементов не наблюдались, разность достоверна при  $p \leq 0.05$  по сравнению с относительным количеством типов клеток (выделено жирным шрифтом): СП — между скумбрией и пеламидой; СБ — между скумбрией и бериксом; ПБ — между пеламидой и бериксом.

Предположительно, различие в содержании зрелых эритроцитов и пониженное их количество в составе эритропоэза берикса относительно скумбрии, может быть объяснено более высоким содержанием гемоглобина в крови берикса чем у скумбрии. При этом, содержание гемоглобина в крови у берикса (Аминева, Яржобек, 1984; Graham, Dickson, 2004) также выше чем у пелакиды, хотя сумма зрелых эритроцитов не отличается статистически между бериксом и пеламидой.

Рассматриваемые виды рыб имеют аналогичную другим видам рыб морфологию и размеры лейкоцитов: лимфоциты ( $\varnothing$  5.0 мкм), моноциты, нейтрофилы и эозинофилы ( $\varnothing$  11.0–12.0 мкм), бластные клетки ( $\varnothing$  10.0 мкм). Гранулоциты этих видов, как и у большинства представителей отряда Perciformes, представлены четырьмя типами: базофилы, эозинофилы, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы (Иванова, 1983; Головина, Тромбицкий, 1989; Балабанова, 2002). При изучении лейкограмм морских костистых рыб из отрядов Clupeiformes, Beloniformes, Gadiformes, Perciformes, Pleuronectiformes и семейств Serranidae, Labridae и Muctophidae были обнаружены следующие типы клеток: гранульные микрофаги (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы) и их незрелые формы, лимфоциты, моноциты (Точилина, 1994, Гордеев и др., 2014).

Результаты изучения лейкоцитов периферической крови скумбрии, пелакиды и берикса свидетельствуют, что их морфофункциональные характеристики гетерогенны и представлены разными по

структуре клетками: лимфоциты, сегментоядерные и палочкоядерные нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, моноциты, метаиелоциты и миелоциты. Основную долю в лейкограмме составляют лимфоциты.

У пелакиды отмечена высокая доля метаиелоцитов в лейкограмме по сравнению со скумбрией и моноцитов по сравнению с обоими изучаемыми видами рыб. Метаиелоциты являются стадией гранулоцитов (микрофагов), участвующих в реакциях фагоцитоза (Галактионов, 2005). Моноциты обладают большой миграционной способностью и активно поглощают не только бактерии, но и продукты распада клеток и тканей (Житнева и др., 1989; Головина, Тромбицкий, 1989). Следовательно, факт повышенного содержания этих клеток (метаиелоцитов и моноцитов) у пелакиды свидетельствует о большем потенциале врожденного иммунитета.

Повышенное содержание базофилов у берикса относительно пелакиды и скумбрии, может быть связано с физиологическим состоянием исследуемых особей. У особей берикса, взятых на клинические исследования, наблюдается 4-я и 3-я стадии половозрелости относительно 2-ой для остальных особей. Исследовались здоровые особи, о чем может свидетельствовать факт, что показатель не выходил за пределы референтных значений для рыб. Доля базофилов в норме у млекопитающих и большинства костистых рыб составляет от 0 до 3% (Иванов и др., 2013; Пронина, Корягина, 2015).

Исследованные показатели крови позволили отметить экологические особенности обитания трех видов рыб семейств скумбриевые Scombridae и бериковые Berycidae. Так, высокий уровень эритропоэза судя по значительному количеству незрелых клеток эритроидного ряда у берикса, вероятно, связан с его пищевыми вертикальными миграциями на большие глубины с высоким давлением и пониженным содержанием кислорода. У пелагиды отмечается более высокое содержание моноцитов, чем у скумбрии и берикса, что свидетельствует о высоком уровне врожденного клеточного иммунитета, представленного фагоцитозом.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аминова В.А., Яржобек А.А. Физиология рыб. М.: Легкая и пищевая пром. 1984. 200 с.
- Балабанова Л.В. Ультраструктура гранулоцитов некоторых видов окунеобразных рыб // Биология внутр. вод. 2002. № 1. С. 79–84.
- Галактионов В.Г. Эволюционная иммунология: учебное пособие. М.: Академкнига, 2005. 408 с.
- Головина Н.А., Тромбицкий И.Д. Гематология прудовых рыб. Кишинев: Штиинца, 1989. 156 с.
- Гордеев И. И., Микряков Д.В., Балабанова Л. В., Микряков В.Р. Состав лейкоцитов периферической крови антарктического клыкача *Dissostichus mawsoni* (Nototheniidea) // Вопр. ихтиол. 2014. Т. 54. № 3. С. 1–4.  
<https://doi.org/10.7868/S0042875214030047>
- Гущин А.В., Кортен А. Питание пелагических рыб в водах Мавритании. 2. Представители семейств Sargangidae, Scombridae, Pomatodidae, Trichiuridae // Вопр. ихтиол. 2016. Т. 56. № 1. С. 68–75.  
<https://doi.org/10.7868/S0042875216010057>
- Гущин А.В., Кортен А. Питание пелагических рыб вод Мавритании. 3. Восточная скумбрия *Scomber colias*, европейская ставрида *Trachurus trachurus*, ставрида-треке *Trachurus trecae* // Вопр. ихтиол. 2017. Т. 57. № 3. С. 308–321.  
<https://doi.org/10.7868/S0042875217030079>
- Житенева Л.Д., Полтавцева Т.Г., Рудницкая О.А. Атлас нормальных и патологически измененных клеток крови рыб. Ростов н/Д.: Ростов. книж. изд-во, 1989. 111 с.
- Иванов А.А., Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., Петрушин А.Б. Клиническая лабораторная диагностика в аквакультуре. Методические указания. М.: Изд-во ТСХА, 2013. 50с.
- Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1983. 184 с.
- Изучение экосистем рыбохозяйственных водоемов, сбор и обработка данных о водных биологических ресурсах, техника и технология их добычи и переработки. Госкомрыболовство России. Москва. ВНИРО. 2004. 299 с.
- Камышников В.В. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям лабораторной диагностики. М.: МЕДПресс-информ, 2004. С. 56–60.
- Козлов Д.А. Биология и промысел низкотелого берикса (*Beryx splendens* Lowe, 1833) на подводных возвышенностях северной части Атлантики. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Калининград, 2004. 23 с.
- Микряков В.Р., Балабанова Л.В. Клеточные основы иммунитета у рыб // Физиология и паразитология пресноводных животных. Л.: Наука, 1979. С. 57–64.
- Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А., Ланурова Т.Б., Попов А.В., Силкина Н.И. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды // М.: Наука, 2001. 126 с.
- Парин Н.В. Рыбы открытого океана. М.: Наука, 1988. 272 с.
- Пронина Г.И., Корягина Н.Ю. Референтные значения физиолого-иммунологических показателей гидробионтов разных видов // Вестн. Астрахан. гос. тех. ун-та. № 4. 2015. С. 103–108.
- Тоцилина Л.В. Лейкоцитарная формула морских рыб // Гидробиол. журн. Т. 30. № 3. 1994. С. 50–57.
- Campo D., Mostarda E., Castriota L., Scarabello M.P., Andaloro F. Feeding habits of the Atlantic bonito, *Sarda sarda* (Bloch, 1793) in the southern Tyrrhenian sea // Fisheries Research. 2006. V. 81. P. 169–175.  
<https://doi.org/10.1016/j.fishres.2006.07.006>
- Castro J.J. Feeding ecology of chub mackerel *Scomber japonicus* in the Canary Islands area // S. Afr. J. mar. Sci. 1993. V. 13. P. 323–328.  
<https://doi.org/10.2989/025776193784287400>
- Collette B.B. Family Scombridae Rafinesque 1815 – mackerels, tunas, and bonitos // Calif. Acad. Sci. 2003. V. 19. 28 p.
- Collette B.B. Scombridae (including Thunnidae, Scomberomoridae, Gasterochismatidae and Sardidae). Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean. Paris: UNESCO, 1986. V. 2. P. 981–997.
- Collette B.B., Nauen C.E. Scombrids of the world. An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos and related species known to date // FAO Species Catalogue. Rome: FAO, 1983. V. 2. 137 p.
- Dudochkin A.S., Kotlyar A.N. On the feeding of alfoncino (*Beryx splendens*) // J. Ichthyol. 1989. V. 29(5) P. 1–8.
- Durr J., Gonzalez J.A. Feeding habits of *Beryx splendens* and *Beryx decadactylus* (Berycidae) off the Canary Islands // Fisheries Res. 2002. V. 54. P. 363–374.  
[https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(01\)00269-7](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(01)00269-7)
- Graham J.B.; Dickson K.A. Tuna Comparative Physiology // The J. Experimental Biology. 2004. Vol. 207 (23). P. 4015–4024.  
<https://doi.org/10.1242/jeb.01267>
- Heemstra P., E. Heemstra Coastal Fishes of Southern Africa // National Inquiry Services Centre. Eastern Cape, 2004. 488 p.
- Heemstra P. Berycidae // Smiths' Sea Fishes. Berlin: Springer-Verlag, 1986. p. 409–410.
- Horn P.L., Forman J., Dunn M.R. Feeding habits of alfoncino *Beryx splendens* // J. Fish Biology. 2010. Vol. 76. P. 2382–2400.  
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02630.x>
- Kells V., Carpenter K.E. A Field Guide to Coastal Fishes. Baltimore: John Hopkins University Press, 2011. 448 p.
- Lehodey P., Grandperrin R. Age and growth of the alfoncino *Beryx splendens* over the seamounts off New Caledonia // Marine Biol. 1996. V. 125 P. 249–258.  
<https://doi.org/10.1007/BF00346305>
- Maigret J., Ly B. Les poissons de mer de Mauritanie // Compiègne: Science Nat., 1986. 213 p.

- Maul G.E.* Berycidae // Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA). Paris: UNESCO, 1990. V. 2. P. 626.
- Moffitt R.B., Kobayashi D.R., Dinardo G.T.* Status of the Hawaiian Bottomfish Stocks // Honolulu: Pacific Islands Fisheries Science Center, 2004. Report H-06-01. 45 p.
- Nielsen J.* Berycidae // Check-list of the fishes of the north-eastern Atlantic and of the Mediterranean (CLOF-NAM). Paris: UNESCO, 1979. V. 1. P. 337.
- Parin N.V., Shcherbachev Y.N., Pakhorukov N.P.* Bottom and near-bottom fishes of the Rio Grande Rise (Southwest Atlantic Ocean) // *J. Ichthyol.* 1995. V. 35(9). P. 205–219.
- Parish N., Wrathmell A., Hart S., Harris J.* The leucocytes of the elasmobranch *Scyliorhinus vanicula* L. A morphological study // *J. Fish. Biol.* 1986. V. 28 (5). P. 545–561.  
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1986.tb05192.x>
- Paxton J.R.* Berycidae. Alfonsinos // FAO species identification guide for fishery purposes. The living marine resources of the WCP. Rome: FAO, 1999. V. 4. P. 2218–2220.
- Ramos A., Moya F., Salmerón F., García P., Carroceda A., Fernández L., González J.F., Tello O., Sáenz J. L., Ballesteros M.* Demersal Fauna on Deep Seamounts of Sierra Leone Rise (Gulf of Guinea, Africa) // NAFO. 2001. CR Doc. 01/149. 4 p.
- Santamaría M.T.G., López-Abellán L.J., Gonzalez J.F.* Growth of alfonsino *Beryx splendens* Lowe 1834 in the South-West Indian Ocean // *African J. of Marine Science.* 2006. V. 28 (1). P. 33–40.  
<https://doi.org/10.2989/18142320609504131>
- Secombes C.J.* The nonspecific immune system: cellular defense // *The fish immune system: organism, pathogen and environment.* London: Acad. Press., 1996. P. 63–105.
- Shimizu T.* Berycidae // FAO species identification sheets for fishery purposes. Western Indian Ocean fishing area 51. 1984. V. 1. 6 p.
- Sommer C., Schneider W., Poutiers J.M.* FAO species identification field guide for fishery purposes // *The living marine resources of Somalia.* Rome: FAO, 1996. 376 p.
- Torres M.A., Ramos F., Sobrino I.* Length-weight relationships of 76 fish species from the Gulf of Cadiz (SW Spain) // *Fish. Res.* 2012. V. 127. P. 171–175.  
<https://doi.org/10.1016/j.fishres.2012.02.001>
- Zorica B., Sinovic G.* Biometry, length-length and length-weight relationships of juveniles and adults of Atlantic bonito, *Sarda sarda*, in the eastern Middle Adriatic Sea // *Acta Adriatica.* 2008. V. 49(1). P. 65–72.

## Peripheral Blood Parameters of Three Species with Different Ecologies (Scombridae and Berycidae)

A. I. Nikitenko<sup>1, #</sup>, G. I. Pronina<sup>2, 3</sup>, A. M. Orlov<sup>5, 6, 7, 8, 9</sup>,  
D. V. Artemenkov<sup>4</sup>, A. N. Stroganov<sup>10</sup>, and V. A. Belayev<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Freshwater fisheries branch VNIRO, Rybnoye village, Dmitrovsky district, Moscow Region, 141821 Russia

<sup>2</sup> Russian Scientific Research Institute of Irrigation Fisheries, Sergeeva street 24, Vorovsky village, Noginsky district, Moscow region, 142460 Russia

<sup>3</sup> Russian State Agrarian University - K.A. Timiryazev Moscow Agricultural Academy, Timiryazevskaya street 49, Moscow, 127550 Russia

<sup>4</sup> Russian Federal Research Institute Of Fisheries and Oceanography, Okruzhnoy proezd 19, Moscow, 105187 Russia

<sup>5</sup> A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Leninsky Avenue 33, Moscow, 119071 Russia

<sup>6</sup> Dagestan State University, Gadzhieva street 43a, Makhachkala, 367000 Russia

<sup>7</sup> Caspian Institute of Biological Resources, Dagestan Federal Research Center RAS, Gadzhieva street 45, Makhachkala, 367000 Russia

<sup>8</sup> Tomsk State University, Lenin Avenue 36, Tomsk, 634050 Russia

<sup>9</sup> Shirshov Institute of Oceanology RAS, Nakhimovskiy Avenue 36, Moscow, 117218 Russia

<sup>10</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

#e-mail: alexey\_nikitenko90@mail.ru

Hematological parameters of the peripheral blood of chub mackerel *Scomber colias*, bonito *Sarda sarda* and alfonsino *Beryx splendens* are studied on materials of scientific monitoring on fishing vessels in the exclusive economic zones of Morocco and Mauritania in 2004–2017. Immature erythropoietic cells were noted in larger number in the alfonsino, which is probably due to its possible diet vertical migrations to great depths with high pressure and low oxygen content. The analysis of leukocyte formula revealed physiological and immunological special aspects. Bonito has a higher monocyte content than chub mackerel and alfonsino, which indicates a high level of innate cellular immunity, represented by phagocytosis.

**Keywords:** mackerel *Scomber colias*, bonito *Sarda sarda*, alfonsino *Beryx splendens*, erythropoiesis, leukocyte formula

УДК 630.1.574.4.

## МИКОРИЗНЫЕ КОМПЛЕКСЫ И ИХ РОЛЬ В ЭКОЛОГИИ БОРЕАЛЬНЫХ ЛЕСОВ (ОБЗОР)

© 2022 г. С. М. Разгулин®

Институт лесоведения РАН, ул. Советская д. 21, с. Успенское, Одинцовский р-н, Московская обл., 143030 Россия

®E-mail: root@ilan.ras.ru

Поступила в редакцию 02.04.2021 г.

После доработки 28.02.2022 г.

Принята к публикации 28.02.2022 г.

Обсуждается функционирование микоризных ассоциаций в лесных экосистемах. Микоризы участвуют в снабжении растений элементами питания и улучшают их рост, но могут и сдерживать развитие растения. Уровень участия экто-эрикоидных микориз в цикле углерода бореальных лесов признается весьма значительным. По данным изотопной индикации роль микориз в цикле азота высока в тундре и менее выражена в бореальных лесах. Микоризы участвуют в разложении органического вещества почвы для получения доступного азота, но ферментативные механизмы этого процесса и пути перемещения N и P из клеток гриба к растению во многом неизвестны. Микоризы препятствуют потерям азота из лесных почв при вымывании. Микоризные сети способствуют процессам лесовосстановления и структурирования насаждений, защищают от патогенов и вредителей.

*Ключевые слова:* микоризные симбиозы, экто-эрикоидные и арбускулярные микоризы, сапрофитная микрофлора, органическое вещество почв, экзоферменты, изотопы азота

**DOI:** 10.31857/S1026347022060142

Под действием климатических изменений, усиления антропогенного пресса и азотизации биосферы происходит смещение границ биома бореальных лесов, снижение биоразнообразия, проникновение инвазивных видов и формирование новых сообществ (Simard, 2009; Cornell, 2011; Anthony *et al.*, 2020; Лукина и др. 2020). На этом фоне увеличивается интерес к микоризным комплексам, принимающим активное участие в трансформации органического вещества лесных почв. Полагают, что минерализующая активность микориз может быть соизмерима с активностью сапротрофной микрофлоры (Read, Peretz-Moreno, 2003). Появляются доказательства того, что микоризные ассоциации способны контролировать не только биогеохимию экосистемы (Lindal, Tunlid, 2015; Zak *et al.*, 2019), но и реакцию на действие глобальных изменений (Averill *et al.*, 2018). Подчеркивается, что учет микоризных комплексов демонстрирует их решающую роль в глобальном, биогеографическом распределении видов растений (Steidinger *et al.*, 2019). Предлагается использование микоризного симбиоза для восстановления и сохранения природных экосистем (Pickles *et al.*, 2020). Вектор развития микоризной экологии склоняется от анализа связей “растение–гриб” к изучению взаимодействия сообществ экзо- и эндофитных микроорганизмов (Smith, Peay, 2020).

К сожалению, отечественные исследования функциональных характеристик микоризных симбиозов остаются немногочисленными (Веселкин 1999; Меняйло и др., 2015; Сизоненко, 2017; Матвиенко, 2017). Данная статья содержит анализ зарубежных публикаций с выделением основных функций микоризных симбиозов в бореальных лесах.

Микоризы очень древние формы жизни, известные с девона (Смит, Рид, 2012). Они образуются на корнях растений при их инфицировании некоторыми видами почвенных грибов, в разной степени способных к жизни без добавочных источников углерода. Полагают, что растение снабжает гриб дополнительным лабильным углеродом, получая взамен элементы минерального питания, прежде всего азота, лимитирующего рост растений в бореальной зоне. Сосуществование грибов и растений широко распространено в природе, симбиозы с грибами образуют около 90% всех растений. До 50000 видов грибов образуют микоризные ассоциации, что составляет от 0.5 до 10% от 0.5–10 млн всех видов грибов (van der Heijden *et al.*, 2015). В настоящее время микоризу трактуют как комплекс, включающий помимо фито- и микобионта, сообщество ассоциативных микроорганизмов, разнонаправленно влияющих на уста-

новление и функционирование симбиоза в природных условиях (Воронина, 2018).

**Основные типы микоризных комплексов.** В лесу наиболее распространенными типами микориз являются эктомикориза, арбускулярная и эрикоидная микоризы (Селиванов, 1981; Каратыгин, 1993; Смит, Рид, 2012).

Эктомикориза (ЭКМ) появилась 100–200 млн лет назад (van der Heijden *et al.*, 2015). На корне растения выражен чехол из грибных гиф, проникающих в корень, но не внутрь клетки и образующих сеть Гартвига. Растения с ЭКМ составляют 2–3% всех растений, но они преобладают в бореальных лесах. Сюда относятся большинство деревьев лесобразующих пород – различные виды сосны, ели, пихты, тсуги, псевдотсуги, лиственницы, березы, ольхи, ивы, дуба, бука, граба, некоторые виды клена. В России максимальное таксономическое разнообразие ЭКМ-грибов наблюдается в хвойно-лиственных лесах умеренной зоны (Каратыгин, 1993). С этим типом микоризы связаны 60% всех деревьев планеты (Steidinger *et al.*, 2019).

Арбускулярная микориза (АМ) – самая древняя группа микориз, возникшая более 400 млн лет назад (van der Heijden *et al.*, 2015). Она облигатно симбиотрофна, относится к эндомикоризам, ее гифы проникают внутрь клеток корня и образуют специфичные структуры – арбускулы. Этот тип микориз образует 80% всех высших растений, преимущественно травянистых. Лесообразующие породы деревьев с АМ преобладают в субтропиках и тропиках (Averill *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2016), поэтому растения с АМ в бореальных лесах играют менее значительную роль, чем ЭКМ-виды (Bennet *et al.*, 2017). Биомасса АМ мицелия обычно на один или два порядка меньше, чем биомасса ЭКМ мицелия (Groenigen *et al.*, 2015). АМ развита у можжевельников, туи, рябины, ясеня, некоторых видов клена, малины и калины (Смит, Рид, 2012).

Разновидностью эндомикориз является эрикоидная микориза (ЭРМ), образующаяся на тонких волосоподобных корнях лесных кустарничков – черники, брусники, голубики, клюквы, толокнянки, багульника, подбела. Считается самым молодым симбиозом, насчитывающим не более 80 млн лет (van der Heijden *et al.*, 2015).

Есть деревья (ольха, ясень, тополь, ива) на корнях которых образуются как ЭКМ так и АМ (Kilpeläinen *et al.*, 2020; François *et al.*, 2020). Наконец, есть группы грибов (эндофиты), способных как к сапротрофному, так и микоризному образу жизни (Baldrian, Kohout, 2017). Обнаружены и новые типы микоризных симбиозов – феремикоризы, развивающиеся без колонизации корней, единичные исследования которых выполнены на сельскохозяйственных культурах (Kariman *et al.*, 2020). Способность микоризных грибов инфицировать растения, избегая их иммунной защиты не

вполне изучена, но полагают, что это комбинация дифференциальной экспрессии генов грибных белков-эффекторов (van der Heijden *et al.*, 2015).

В бореальных лесах с кислыми грубогумусными почвами, низкой активностью минерализации азота с преобладанием аммонификации, распространены ЭКМ и ЭРМ с высоким уровнем биоразнообразия. На юге бореальной зоны с менее кислыми почвами и выраженной нитрификацией встречаются АМ. Такое распределение микоризных комплексов подтверждается при меридиональном исследовании лесов Европы и Северной Америки (Read, Perez-Moreno, 2003), а также на склонах возвышенностей с градиентом условий увлажнения (Giesler *et al.*, 1998).

**Распространение микориз в лесных экосистемах.** Микотрофны все лесообразующие породы, хотя и в разной степени. У взрослых деревьев микоризы образуются до глубины 2.5–3 м (Лобанов, 1971). В древесном ярусе лесных экосистем микотрофность близка к 100%, снижаясь в кустарниковом и кустарниково-травяном ярусе до 60% и 20–40% (Селиванов, 1981; Каратыгин, 1993; Hogberg *et al.*, 1996).

Микоризные грибы преимущественно аэробы, поэтому их развитие и разнообразие снижается в переувлажненных экотопах. Нежелательна и сухость почвы. Низкая освещенность угнетает фотосинтез и снижает поступление фотоассимилятов в микобионт, подавляя его развитие (Селиванов, 1981; Robertson *et al.*, 2006). Большинство микоризных грибов мало специфичны и могут образовывать микоризы у различных деревьев (Лобанов, 1971; Селиванов, 1981), но не исключаются и предпочтения грибов в колонизации определенных видов деревьев (Rasmussen *et al.*, 2018).

**Функционирование микоризных комплексов в лесных экосистемах.** В почвенном профиле сапротрофные грибы могут доминировать в верхнем слое подстилки, с оборотом массы горизонта ~4 лет (Šnajdr *et al.*, 2008; Lindahl, Tunlid, 2015), тогда как ЭКМ грибы, могут играть важную роль в более разложившемся гумусовом слое (Bödeker *et al.*, 2014; Baskaran *et al.*, 2017). Гифы микоризных грибов значительно увеличивают ассимиляционную поверхность корневых систем растений.

На функционирование микориз влияет целый комплекс внешних и внутренних факторов. Когда доступность азота для растения снижается, увеличивается интенсивность микоризной инфекции и (или) возрастает трансферное отношение – количество элемента, перемещенного грибом из общего потока в растение-хозяина. С увеличением прихода элемента поток углерода в микоризу снижается. Таким образом, растения, отдавая микоризным грибам часть своих фотоассимилятов для роста и дыхания, регулируют свою потребность в элементах питания (Michelsen *et al.*, 1996;

Baskaran *et al.*, 2017). Это определяет соотношение “ущерб–выгода” и баланс мутуализма и паразитизма в симбиозе растения и гриба. Данная проблема является одной из главных при исследовании микоризных комплексов.

Улучшение роста у саженцев лесных деревьев с микоризами многократно отмечалось с начала XX в. (Лобанов, 1971; Baxter, Dighton, 2001; Смит, Рид, 2012; Simard *et al.*, 2012; Bennett *et al.*, 2017). Полагают, что саженцы получают больше пользы от симбиоза, чем взрослые растения (van der Heijden *et al.*, 2015). В целом, отношения между партнерами в симбиозе очень динамичны и могут варьировать в течение вегетации, этапа сукцессии и жизненного цикла от мутуализма до паразитизма, когда гриб переключает “на себя” большую часть фотоассимилятов растения, что ухудшает их рост (Dicke *et al.*, 2015; Ibáñez, McCarthy-Neumann, 2016; Baskaran *et al.*, 2017; Ågren *et al.*, 2019). Известно, что снижение роста в симбиотрофных растениях происходит и из-за усиления иммобилизации азота микоризным мицелием (Correa *et al.*, 2012; Grman, Robinson, 2013; Sponseller *et al.*, 2016), а содержание азота в листьях отрицательно коррелирует с длиной гиф (Groenigen *et al.*, 2015). Указанные процессы не являются взаимоисключающими (Ågren *et al.*, 2019).

Стехиометрическое несоответствие между органическим веществом почвы с низким содержанием азота и грибом с высоким содержанием азота оказалось узким местом в выполнении грибом функции источника дополнительного азота для растений (Ågren *et al.*, 2019). При росте на бедных азотом почвах, гриб будет неизбежно иммобилизовать значительную часть поглощаемого им азота. Растение увеличивает долю фотоассимилятов, поставляемых грибам, чтобы увеличить поток азота от грибов, но это еще в большей степени стимулирует рост грибов и усиливает ассимиляцию элемента. Гриб начинает “обманывать” дерево и по углероду, и по азоту, что может привести к ухудшению роста деревьев на бедных азотом почвах, особенно на стадии поздней сукцессии. На этом этапе могут отмечаться отрицательные корреляции между ростом деревьев и численностью ЭКМ (van der Heijden *et al.*, 2015; Groenigen *et al.*, 2015; Sponseller *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2016).

АМ облигатны и во многих (но не во всех) случаях мутуалистичны, для них характерна меньшая доля фотоассимилятов, направляемых растением-хозяином в микоризу – 10–20%, против 20–50% у растений с ЭКМ (van der Heijden *et al.*, 2015; Smith, 2015).

Увеличение поступления азота с атмосферными осадками, внесение удобрений, высокий уровень нетто-минерализации азота в почве, часто сдерживало развитие одних микориз (Holopainen, Heinonen-Tanski, 1993; Nilsson *et al.*, 2007; Lilleskov

*et al.*, 2008), снижало биоразнообразие ЭРМ (Van Geel *et al.*, 2020), но могло стимулировать развитие других микоризных комплексов из групп ЭКМ и ЭРМ (Kranabetter, Mac-Kenzie, 2010). Добавочный азот снижал активность лигнинолитических ферментов, но увеличивал протеолиз (Lucas, Casper, 2008). В редких случаях внесенный азот не изменял уровень развития ЭКМ (Rossi *et al.*, 2012). В растениях с АМ только  $\text{PO}_4^-$  и  $\text{NO}_3^-$  уменьшали колонизацию корней, а калий, кальций, магний, сульфат и железо, не влияли на развитие микоризы (Wipf *et al.*, 2019). Добавление смеси фосфатов и извести в почву смешанного леса снижало рост ЭКМ деревьев и увеличивало рост деревьев с АМ (DeForest, Snell, 2020). Снижение биомассы ЭКМ-грибов вызывало увеличение потерь азота из почвы при вымывании, что указывает на регулируемую роль микориз в удержании азота лесом (Nilsson *et al.*, 2007; Bahr *et al.*, 2013; van der Heijden *et al.*, 2015). В лесах с АМ отмечено более высокое выщелачивание нитратов, чем в ЭКМ-насаждениях (Midgley, Phillips, 2014).

Снижение потока фотоассимилятов в корневые системы деревьев вызванное кольцевой обрезкой ствола, повреждениями копытными и насекомыми-вредителями, значительно уменьшает количество микориз по сравнению с контролем (Rossow *et al.*, 1997; Hogberg *et al.*, 2007; Kaiser *et al.*, 2011; Brzostek *et al.*, 2015; Gorzelak *et al.*, 2015). Как сапротрофные, так и ЭКМ-грибы размножаются летом, в период высокой фотосинтетической активности, что подчеркивает их зависимость от фотоассимилятов автотрофов (Cheeke *et al.*, 2017).

**Роль микоризных комплексов в цикле углерода.** В бореальных лесах сток углерода преобладает над его эмиссией (Phillips *et al.*, 2014). Ежегодно первичной продукцией биомы связывается ~0.5 Гт С, большая часть которого в конечном итоге поступает в почву, содержащую 30% мировых запасов углерода (Phillips *et al.*, 2014; Scharlemann *et al.*, 2014). Развитие ЭРМ способствует формированию полифенол-белковых комплексов, повышающих устойчивость органического вещества почвы к разложению (Clemmensen *et al.*, 2013) и вместе с низкими температурами консервирующих углеродный пул почвы (Lindahl, Tunlid, 2015). В этих почвах от 50 до 70% накопленного углерода происходит от корней и связанных с ними микоризных комплексов (Clemmensen *et al.*, 2013). Биомасса ЭКМ оценивается до  $600 \text{ kg ga}^{-1}$ , при близких значениях продукции (Wallander *et al.*, 2004), что составляет не менее 30% всей микробной биомассы (Pellitier, Zak, 2018) и ~50% общей массы грибов в почвах бореальных лесов (Clemmensen *et al.*, 2013).

На основе работы (Gadgil, Gadgil, 1971), показавшей, что ЭКМ грибы могут подавлять сапротрофную активность почвы, исследований (Orwin *et al.*, 2011; Clemmensen *et al.*, 2013; Baskaran *et al.*, 2017)

была разработана концепция конкурентных отношения между растениями, микоризными грибами и сапротрофной микрофлорой за азот, что может снижать активность свободноживущих микроорганизмов и способствовать накоплению ОВ в лесной почве в виде мицелиальных остатков (Lindahl, Tunlid, 2015; Zak *et al.*, 2019; Wipf *et al.*, 2019; Smith, Peay, 2020). Это согласуется с выводами (Averill *et al.*, 2014), показавших, что почва в экосистемах с преобладанием ЭКМ, содержит на 70% больше углерода на единицу азота, чем почва экосистем с АМ. Это объясняет накопление углерода в почвах бореальных лесов и его стабильность, а также является более сильным детерминантом запасов углерода в почве, чем климатические переменные. Однако с ЭКМ деревьями сравнивались насаждения с АМ не бореальной зоны, а из тропиков и субтропиков, что не вполне корректно. Дальнейшие исследования лесов США показали, что большее накопление углерода в почвах ЭКМ лесов по сравнению с АМ лесами происходит при низких уровнях поступления азота с атмосферными осадками. При высоком приходе азота количество углерода в почве ЭКМ-лесов снижается и разница с АМ-лесами исчезает (Averill *et al.*, 2018). Экспериментальное исключение микориз ускорило разложение подстилки только в сосновом лесу, но не влияло на ее деструкцию в других типах леса (Матвиенко, 2017; Fernandez *et al.*, 2020), а ферментативная активность ЭКМ проб почвы в северных лесах была близка к активности сапротрофной микрофлоры или немного превосходила ее (Phillips *et al.*, 2014). В глобальном аспекте вклад микориз в “дыхание почвы” оценивается в 15% (Han *et al.*, 2021). В целом, признается ключевая роль ЭКМ-грибов в цикле углерода в бореальных лесах при ограниченности знаний об их функционировании (Lindahl, Tunlid, 2015; Zak *et al.*, 2019; Ågren *et al.*, 2019; Smith, Peay, 2020).

**Роль микориз в снабжении растений элементами питания.** Снабжение растений элементами питания является главной функцией микориз. Участие микориз в снабжении растений азотом, фосфором, калием было многократно продемонстрировано в экспериментах с саженцами многих лесообразующих пород (Смит, Рид, 2012).

Используя мощный аппарат гидролитических и окислительных экзоферментов, ЭКМ разлагают белки, полифенол–белковые комплексы, хитин, липиды, целлюлозу, целлобиозу, гемицеллюлозу, пектин, монофенолы, полифенолы, фосфорорганические полимеры (Read, Perez-Moreno, 2003). Отдельные виды минерализуют лигнин (Brzostek, Finci, 2011). Микоризы поглощают образованные в результате гидролиза азотсодержащих комплексов аминокислоты и минеральный азот и передают корням растений, снижая зависимость последних от сапротрофной микрофлоры (Lindahl, Tunlid, 2015). Есть утверждение, что деполимеризация

белково–полифенольных комплексов ЭКМ-грибами происходит при участии сапротрофной микрофлоры (Groenigen *et al.*, 2015).

В клетках гриба минеральный азот превращается в глутамин и глутамат. Ионы ортофосфата перемещаются в мицелий белковыми транспортерами, где внутри грибной клетки он может оставаться в форме иона  $PO_4^-$ , превращаться в полифосфат или нуклеозид-трифосфат. Полагают, что грибковые вакуоли служат основными хранилищами соединений азота и фосфора. Конкретные механизмы транспорта этих элементов в растение-хозяин до конца неясны (Nehls, Plassard, 2018).

Увеличение разнообразия видов грибов, образующих ЭКМ у проростков березы (2 вида против 1) улучшало их рост, а при большем разнообразии (до 4 видов) возросло содержание *N* и *P* в растении, хотя фактор разнообразия объяснял всего 11 и 18% вариации концентраций этих элементов (Baxter, Dighton, 2001). Поглощение фосфора также возрастало по мере увеличения разнообразия грибов (Kanekar *et al.*, 2018).

Полагают, что ЭКМ-комплексы используют ОВ почвы не столько как источник метаболического углерода, а для метаболической деградации сложных *N*-содержащих комплексов, освобождая азот из органических пулов (Lindahl, Tunlid, 2015; Baskaran *et al.*, 2017; Pellitier, Zak, 2018). Микоризный образ жизни привел к потере генов, отвечающих за синтез ферментов, разрушающих углеродный скелет органического вещества почвы (Waller *et al.*, 2018). ЭКМ геномы имеют меньше лигноцеллюлозолитических генов, чем их сапротрофные предки (van der Heijden *et al.*, 2015; Pellitier, Zak, 2018). Эксперименты в чистых культурах ЭКМ показали, что окисление органического вещества и экспрессия связанных ферментов и гидроксильных радикалов запускаются добавлением глюкозы, предполагая, что углевод может поступать из растения-хозяина. С учетом этих данных была разработана гипотеза “*N*-майнинга”, полагающая, что ЭКМ-грибы окисляют органическое вещество в разной степени, чтобы получить небольшие органические азотсодержащие молекулы (пептиды), оставляя после себя относительно богатые углеродом субстраты. Однако прямых доказательств реализации этого процесса в природе нет (Pellitier, Zak, 2018; Zak *et al.*, 2019). Для выхода из этой ситуации не исключают перенос бактериальных генов, кодирующих расщепляющие ферменты, грибам (Dicke *et al.*, 2015).

Оценки вклада микоризных комплексов в азотный и фосфорный режимы растений варьируют в широких пределах, от 0 до 80% (van der Heijden *et al.*, 2015) и, вероятно, в верхних границах представляются излишне оптимистичными. Кроме того, в лесах умеренной зоны затраты азота на годовую продукцию фитоценоза и продук-

тивность минерализации соединений азота в почве близки (Nadelhoffer *et al.*, 1985), что ставит под сомнение значительное участие микориз в азотном цикле.

Значительный интерес представляют исследования микориз, выполненные методом изотопной индикации не в лаборатории (каких большинство), а в природе. В тундрах и хвойных лесах Аляски и Скандинавии ЭКМ и ЭРМ поставляют через мембранный транспорт фитоценозу обедненные  $^{15}\text{N}$  олигопептиды и аминокислоты, что приводит к снижению величины  $\delta^{15}\text{N}$  в листьях и хвое до  $-8.5\text{...}-11\%$  по отношению к грибам. С ростом доступности азота преимущественный поток  $^{14}\text{N}$  от грибов к растениям сокращается,  $\delta^{15}\text{N}$  в растении возрастает (Michelsen *et al.*, 1998; Hobbie, 2008). Микоризные грибы обеспечивают 30–60% азотной потребности фитоценоза тундры (Макаров, 2019). Это подтверждает и низкий уровень минерализации азота в почве этих экосистем (Hart, Gunther, 1989), не компенсирующий затраты азота на формирование годового прироста фитоценозов (Shaver, Chapin, 1991).

В насаждении ели черной (США, штат Аляска) значения  $\delta^{15}\text{N}$  и концентрации N в хвое положительно коррелировали с ростом деревьев, но скорость роста отрицательно коррелировала с поглощением азота микоризой. На вершине склона ель в меньшей степени зависела от поглощения азота микоризами, чем у подножья, где ухудшалась доступность азота почвы (Tanaka-Oda *et al.*, 2016). Эта необычная ситуация менялась на более распространенную в катенах Фенноскандии, где растения с ЭКМ и ЭРМ размещались в верхней части склона с низкими значениями pH почвы и малым содержанием неорганического азота. Внизу катены с более высокими показателями pH почвы доминировали потенциально АМ или безмикоризные травы, концентрации минерального азота были высокие. Содержание азота в листьях и корнях резко увеличивалось от верхней к нижней части катены (Giesler *et al.*, 1998).

В лесах умеренной зоны (США, штат Нью-Гэмпшир) обеднение листьев и хвои изотопом  $^{15}\text{N}$  значительно меньше,  $\delta^{15}\text{N}$  варьировала от  $-0.7$  до  $-4.7\%$ , составляя, в среднем,  $-1.7\%$ . У клена с АМ эта величина составила от  $-2.41$  до  $-4.7\%$ , а у бука с ЭКМ от  $-0.74$  до  $-1.51\%$  (Averill, Finzi, 2011; Pardo *et al.*, 2013). Эти различия могут указывать на разный вклад микориз в азотный режим растений с изменением географической широты.

Возможно, роль микориз в изотопной индикации носит региональный характер. В лесах Европы, Северной Америки, Чили, корреляция между  $\delta^{15}\text{N}$  в листьях и приходом азота с атмосферными осадками отсутствовала в ЭКМ-деревьях и была положительной в деревьях с АМ (Макаров, 2019). Также известно, что фракционирование изотопов азота

может зависеть от источников азотного питания, преобладания нитрификации в цикле азота почвы, и ландшафтной истории участка, а не только от функционирования микориз (Pardo *et al.*, 2013).

Активность ЭРМ рододендрона (Аппалачи, США) по способности извлекать азот из полифенол-белковых комплексов почвы была выше, чем у растений с ЭКМ и АМ (Wurzburger, Hendrick, 2007). В другом исследовании отмечаются близкие активности ЭРМ и ЭКМ в получении азота из органических источников (Adamczyk *et al.*, 2017).

АМ-грибы активно участвуют в фосфорном питании растений. АМ колонизирует корни актиноризных растений (ольху), с актиномицетом *Frankia*, и корни бобовых (клевера), образуя “двойной симбиоз”, обеспечивая энергетически затратный процесс азотфиксации Р для синтеза АТФ и возможно, молибденом, входящим в состав нитрогеназ (Смит, Рид, 2012). Почвенный фосфор входит в состав ортофосфатов и органических соединений, представленных преимущественно фосфолипидами, нуклеотидами и нуклеиновыми кислотами. Соединения фосфора прочно сорбируются на гидроксидах железа и алюминия и труднодоступны для растений (Lang *et al.*, 2017). Растения могут поглощать ортофосфат из почвенного раствора только через специфические белки-переносчики фосфата, экспрессируемые в корнях, образуя зону фосфатного истощения вокруг корня. Гифы АМ растут за пределами зоны истощения и, имеют доступ к ресурсам, недоступным для корней растений. Затем фосфат поглощается гифами и передается в арбускулы. Механизм передачи иона в апопластном интерфейсе растению остается неизвестным (Wipf *et al.*, 2019).

Возможности АМ грибов выделять экзоферменты, разлагающие органическое вещество почвы очень ограничены (Groenigen *et al.*, 2015), но есть сообщения о наличии у них кислых фосфатаз, разлагающих фосфорсодержащие органические соединения (Martin *et al.*, 2018). Гифы грибов с АМ поглощают как ионы  $\text{NH}_4^+$  и  $\text{NO}_3^-$ , так и аминокислоты, и пептиды. Эти соединения превращаются в аргинин и передаются в этой форме через гифы к корням хозяина (Wipf *et al.*, 2019). Способности АМ растений усваивать минеральные и органические формы азота подтверждены экспериментально (Read, Perez-Moreno, 2003; Kranabetter, MacKenzie, 2010). Причем растения с АМ (овсяница алтайская и иван-чай) в лесах Аляски ассимилировали больший набор аминокислот, чем немикоризные виды (Groenigen *et al.*, 2015). В целом, многие черты биологии АМ остаются неисследованными (Martin *et al.*, 2018).

**Микоризные сети (МС) и их роль в бореальных лесах.** ЭКМ-грибы образуют физическую оболочку вокруг молодых питающих корней, обеспечивая более высокую защиту от антагонистов, чем АМ-

грибы (Bennet *et al.*, 2017). В лесных экосистемах гифы эктомикоризных чехлов связывают между собой отдельные деревья из различных ярусов, образуя единую экологическую сеть (Селиванов, 1981). Кустарники и травы подлеска связаны между собой мицелием АМ (van der Heijden *et al.*, 2015). Одной из причин образования МС является универсальность отношений между грибами и растениями.

Через МС проходят потоки воды, углерода, азота, фосфора, микроэлементов передается множество соединений ризосферы – ауксинов, алкалоидов, терпенов, цитокининов. Это сигналы, регулирующие многие аспекты симбиоза – уровень инвазии, углеродный баланс в системе “дерево–гриб”, стресс, гормональный баланс. Эти сигналы поступают и от микоризы и имеют перекрестный характер. Сигналы стресса передаются от поврежденных растений к здоровым через МС даже быстрее, чем аминокислоты и вода, соответственно (одни сутки и 1–3 сут). Через гифальный мицелий перемещаются также аллелохимические соединения, тиофены, пестициды, снижающие рост растений-приемников (Gorzalak *et al.*, 2015).

В смешанном лесу (Канада, Британская Колумбия) направление переноса углерода фотосинтеза дважды менялось за вегетацию. Сначала углерод передавался весной от быстрорастущей дугласии к березе, с распускающимися почками. Летом этот поток был направлен от березы к дугласии и осенью вновь шел от дугласии к березе, с желтеющей листвой (Simard, 2009). Так через МС происходило перераспределение потоков углерода, с реализацией принципа наибольшей потребности. Механизмы передвижения веществ не вполне ясны, но полагают, что оно происходит по градиенту концентраций в системе “источник–сток” (Simard *et al.*, 2012).

В лесу МС связывают молодые деревья со старыми, что улучшает рост саженцев снятием острой конкуренции с другими растениями, перемещая к их корням дополнительную влагу и элементы питания, что в значительной степени способствует лесовосстановлению (Simard *et al.*, 2012; Barker *et al.*, 2013; Gorzalak *et al.*, 2015). Саженцы колонизируются микоризными грибами очень быстро, в течение 3–6 дней после появления всходов (van der Heijden *et al.*, 2015).

МС не могут быть основным путем поглощения воды для растения-хозяина, но они могут быть полезными в эпизоды засухи, благодаря своей способности обеспечивать минимальные требования для выживания растения. Пока снабжающая роль ЭКМ водой показана только для саженцев (Lehto, Zwiazek, 2011). Отмечена более низкая эффективность АМ в условиях низких температур и засухи по сравнению с ЭКМ (Kilpeläinen *et al.*, 2020).

В зрелых лесах микоризы выполняют структурообразующую функцию. ЭКМ-деревья стимулируют рост окружающих их ЭКМ-саженцев, а деревья с АМ угнетают развитие АМ-растений из своего окружения (Johnson *et al.*, 2018; Sasaki *et al.*, 2019). ЭКМ-грибы защищают деревья от патогенов и вредителей, способствуя выработке монотерпенов, лучше, чем АМ (Bennett *et al.*, 2017; Kanekar *et al.*, 2018; Waller *et al.*, 2018).

Полагают, что МС поддерживают жизнь бесхлорофилльных и низко хлорофилльных растений. В МС уровень передачи углерода бесхлорофилльным микогетеротрофным видам и видам с пониженным содержанием хлорофилла (грушанковые и орхидные) составляет 95–100% и 0–85% соответственно, что не превышает 10% от необходимого у автотрофных членов сетей (Simard *et al.*, 2012).

В лесных экосистемах деревья являются главным источником, снабжающим углеродом микоризные сети и оказывают наследственное влияние на сетевые микоризные грибы, почвенные микроорганизмы, сообщества беспозвоночных и птиц, что позволяет предположить групповой отбор. Этот фактор способен объяснить, почему леса, с большим видовым разнообразием, более продуктивны и более устойчивы к атакам насекомых и болезням, чем монокультуры (Gorzalak *et al.*, 2015).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микоризные грибы выполняют широкий спектр экосистемных функций – снабжают растения элементами питания, способствуют почвообразованию и агрегации почвы, увеличивают устойчивость растений к засухе, загрязнению тяжелыми металлами, болезням, патогенам и стрессу, участвуют в лесовосстановлении и влияют на структуру лесных сообществ.

Микоризные комплексы во многом обеспечивают функционирование биогеохимического цикла углерода в бореальных лесах. В цикле азота роль микориз значительна в экосистемах высоких широт и менее выражена в лесах умеренной зоны. Микоризы могут существенно сократить потери азота из лесных почв при вымывании. Микоризы участвуют в разложении органического вещества почвы для получения доступного азота, но ферментативные механизмы этого процесса во многом неизвестны. Не до конца известны и конкретные механизмы передачи азота и фосфора от гриба к растению.

Грань между мутуализмом и паразитизмом в микоризных комплексах остается весьма тонкой. В некоторых почвенно-экологических ситуациях микоризы ограничивают рост растений.

Микоризы изучают преимущественно в лаборатории, что создает проблему экстраполяции полученных результатов на природные экосистемы.

Исследования микориз в природе остаются единичными и далекими от получения полных количественных оценок функционирования симбиотических комплексов, поэтому работы в этом направлении необходимы и очень важны.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Веселкин Д.В.* Реакция эктомикориз хвойных на техногенное загрязнение: Автореф. дис. ... канд. биол. наук (03.00.16.экология). Екатеринбург: Институт экологии растений и животных УРО РАН, 1999. 18 с.
- Воронина Е.Ю.* Зри в корень: что нам известно о природе микоризного симбиоза и что еще предстоит узнать // Материалы IV (XII) Международной ботанической конференции молодых учёных в Санкт-Петербурге 22–28 апреля 2018 г. 2018 СП.: БИН РАН. С. 10–13.
- Каратыгин И.В.* Коэволюция грибов и растений. С-П.: Гидрометеоздат, 1993. 116 с.
- Лобанов Н.В.* Микотрофность древесных растений. М.: Лесная промышленность, 1971. 216 с.
- Лукина Н.В., Гераськина А.П., Горнов А.В., Шевченко Н.Е., Куприн А.В., Чернов Т.И., Чумаченко С.И., Шанин В.Н., Кузнецова А.И., Тебенькова Д.Н., Горнова М.В.* Биоразнообразие и климаторегулирующие функции лесов: актуальные вопросы и перспективы исследований // Вопросы лесной науки. 2020. Т 3. № 4. С. 1–90.
- Макаров М.И.* Роль микоризы в трансформации соединений азота в почве и в азотном питании растений (обзор) // Почвоведение. 2019. № 2. С. 220–223.
- Матвиенко А.И.* Влияние азота на минерализацию углерода в почвах под лиственницей сибирской и сосной обыкновенной. Автореф. дис... канд. биол. наук (03.02.08–экология). Красноярск: Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН, 2017. 21 с.
- Меняйло О.В., Матвиенко А.И., Степанов А. Л., Макаров М.И.* Определение потока CO<sub>2</sub> из почв: роль глубины колец // Экология. 2015. № 2. С. 120–124.
- Селиванов И.А.* Микосимбиотрофизм как форма консортивных связей в растительном покрове Советского Союза. М.: Наука, 1981. 183 с.
- Сизоненко Т.А.* Дыхательная активность эктомикориз ели сибирской и сосны обыкновенной в средней тайге // Лесоведение, 2017, № 3, С. 196–204.
- Смит С.Э., Рид Д.Дж.* Микоризный симбиоз. Пер. с 3-го англ. издания Е.Ю. Ворониной. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2012. 775 с.
- Adamczyk B., Simon J., Kitunen V., Adamczyk S., Smolander A.* Tannins and their complex interaction with different organic nitrogen compounds and enzymes: old paradigms versus recent advances // Chemistry Open. 2017. V. 6. P. 610–614.
- Ågren G., Hyvönen R., Baskaran P.* Ectomycorrhiza, friend or foe? // Ecosystems. 2019. V. 22. P. 1561–1572.
- Anthony M., Stinson K., Moore J. Frey S.* Plant invasion impacts on fungal community structure and function depend on soil warming and nitrogen enrichment // Oecologia. 2020. V. 194. P. 659–672.
- Averill C., Finzi A.* Increasing plant use of organic nitrogen with elevation is reflected in nitrogen uptake rates and ecosystem δ<sup>15</sup>N // Ecology. 2011. V. 92. P. 883–891.
- Averill C., Turner B.L., Finzi A.C.* Mycorrhiza-mediated competition between plants and decomposers drives soil carbon storage // Nature. 2014. T. 505. P. 543–546.
- Averill C., Dietze C., Bhatnagar J.* Continental-scale nitrogen pollution is shifting forest mycorrhizal associations and soil carbon stocks // Global Change Biology. 2018. V. 24. P. 4544–4553.
- Bahr A., Ellstrom M., Akselsson C., Ekband A., Mikusinska A., Wallander H.* Growth of ectomycorrhizal fungi mycelium along spruce forest nitrogen deposition gradient and its effect on nitrogen leakage // Soil Biol. Biochem. 2013. V. 59. P. 38–48.
- Baldrian P., Kohout P.* Interactions of saprotrophic fungi with tree roots: can we observe the emergence of novel ectomycorrhizal fungi? // New Phytol. 2017. V. 215. P. 511–513.
- Barker S., Simard S., Jones M., Durall D.* Ectomycorrhizal fungal community assembly on regenerating Douglas-fir after wildfire and clearcut harvesting // Oecologia. 2013. V. 172. P. 1179–1189.
- Baskaran P., Hyvönen R., Berglund S., Clemmensen K., Ågren G., Björn D., Lindahl B., Manzoni S.* Modelling the influence of ectomycorrhizal decomposition on plant nutrition and soil carbon sequestration in boreal forest ecosystems // New Phytol. 2017. V. 213. P. 1452–1465.
- Baxter W., Dighton J.* Ectomycorrhizal diversity alters growth and nutrient acquisition of grey birch (*Betula populifolia*) seedlings in host–symbiont culture conditions // New Phytol. 2001. V. 152. P. 139–149.
- Bennett A., Maherali H., Reinhart K., Lekberg Y., Hart M., Klironomos J.* Plant–soil feedbacks and mycorrhizal type influence temperate forest population dynamics // Science. 2017. V. 355. P. 181–184.
- Bödeker I., Clemmensen E., Boer W., Martin F., Olson Å., Lindahl D.* Ectomycorrhizal Cortinarius species participate in enzymatic oxidation of humus in northern forest ecosystems // New Phytol. 2014. V. 203. P. 245–256.
- Brzostek E., Dragoni D., Brown Z., Richard P. Phillips R.* Mycorrhizal type determines the magnitude and direction of root-induced changes in decomposition in a temperate forest // New Phytol. 2015. V.206. P. 1274–1282.
- Brzostek E., Finci A.* Substrate supply, fine root, and temperature control proteolytic enzyme activity in temperate forest soils // Ecology. 2011. V. 92. P. 892–902.
- Cheeke T., Phillips R., Brzostek E., Rosling A., Bever J., Fransson P.* Dominant mycorrhizal association of trees alters carbon and nutrient cycling by selecting for microbial groups with distinct enzyme function // New Phytol. 2017. V. 214. P. 432–442.
- Clemmensen K., Bahr A., Ovaskainen O., Dahlberg A., Ekblad A., Wallander H., Stenlid J., Finlay R., Wardle D., Lindahl B.* Roots and associated fungi drive long-term carbon sequestration in boreal forest // Science. 2013. V. 339. P. 1615–1618.
- Correa A., Gurevitch, J., Martins-Loucao, M.A., Cruz C.* C allocation to the fungus is not a cost to the plant in ectomycorrhizae // Oikos. 2012. V. 121. P. 449–463.

- Cornell S. Atmospheric nitrogen deposition: revisiting the question of the importance of the organic component // Environ. Poll. 2011. V. 159. P. 2214–2222.
- DeForest J., Snell R. Tree growth response to shifting soil nutrient economy depends on mycorrhizal associations // New Phytol. 2020. V. 225. P. 2557–2566.
- Dickie I., Alexander I., Lennon S., Öpik M., Selosse M.-A., van der Heijden M., Martin F. Evolving insights to understanding mycorrhizas // New Phytol. 2015. V. 205. P. 1369–1374.
- Fernandez C., See C., Kennedy P. Decelerated carbon cycling by ectomycorrhizal fungi is controlled by substrate quality and community composition // New Phytol. 2020. V. 226. P. 569–582.
- François P., Melanie D., Jones D., Dickie J. Dual-mycorrhizal plants: their ecology and relevance // New Phytol. 2020. V. 225. P. 1835–1851.
- Gadgil R. & Gadgil P. Mycorrhiza and litter decomposition // Nature. 1971. V. 233. P. 133.
- Giesler R., Högberg M., Högberg P. Soil chemistry and plants in fennoscandian boreal forest as exemplified by a local gradient // Ecology. 1998. V. 79. P. 119–137.
- Gorzela M., Asay F., Pickles B., Simard S. Inter-plant communication through mycorrhizal networks mediates complex adaptive behaviour in plant communities // AoB PLANTS. 2015. V. 7. P. 1–13.
- Grman E., Robinson T.M.P.: Resource availability and imbalance affect plant-mycorrhizal interactions: a field test of three hypotheses // Ecology. 2013. V. 94. P. 62–71.
- van Groenigen J., Huygens D., Boeckx P., Kuyper Th., Lubbers I., Rütting T., Groffman P. The soil N cycle: new insights and key challenges // SOIL. 2015. V. 1. P. 235–256.
- Han M.G., Feng J.G., Chen Y., Sun L.J., Fu L.C., Zhu B.A. Mycorrhizal mycelial respiration: a substantial component of soil respired CO<sub>2</sub> // Soil Biol. & Biochem. 2021. V. 163. P. 108454.
- Hart S., Gunther M. In situ estimates of annual net mineralization and nitrification in subarctic watershed // Oecologia. 1989. V. 80. P. 284–288.
- van der Heijden M.G.A., Martin M., Selosse M.-A., Sanders R. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future // New Phytol. 2015. V. 205. P. 1406–1423.
- Hobbie E., Hobbie J. Natural abundance of <sup>15</sup>N in nitrogen-limited forests and tundra can estimate nitrogen cycling through mycorrhizal fungi: a review // Ecosystems. 2008. V. 11. P. 815–830.
- Hogberg P., Hogberg L., Schinkel H., Hogberg M., Johannisson C., Walimark H. <sup>15</sup>N abundance of surface soils, roots and mycorrhizas in profiles of European forest soils // Oecologia. 1996. V. 108. P. 207–214.
- Hogberg M., Hogberg P., Myrold D. Is microbial community composition in boreal forest soil determined by pH, C-to-N ratio, the trees, or all three? // Oecologia. 2007. V. 150. P. 590–601.
- Holopainen T., Heinonen-Tanski H. Effect of different nitrogen sources on the growth of Scots pine seedlings and the ultrastructure and development of their mycorrhizae // Can. J. For. Res. 1993. V. 23. P. 362–372.
- Ibáñez I., McCarthy-Neumann S. Effects of mycorrhizal fungi on tree seedling growth: Quantifying the parasitism–mutualism transition along a light gradient // Can. J. For. Res. 2016. V. 46. P. 48–57.
- Johnson D., Clay K., & Phillips R. Mycorrhizal associations and the spatial structure of an old-growth forest community // Oecologia. 2018. V. 186. P. 195–204.
- Kaiser C., Fuchslueger L., Koranda M., Gorfer M., Stange K., Kitzner B. et al. Plants control the seasonal dynamics of microbial N cycling in a beech forest soil by below-ground C allocation // Ecology. 2011. V. 92. P. 1036–1051.
- Kanekar S., Cale J., Erbilgin N. Ectomycorrhizal fungal species differentially affect the induced defensive chemistry of lodgepole pine // Oecologia. 2018. V. 188. P. 395–404.
- Kariman K., Scanlan G., Boitt G., Rengel Z. Ferromycorrhizal symbiosis confers growth and nutritional benefits to mycorrhizal and non-mycorrhizal crops // Soil Biol. Biochem. 2020. V. 151. P. 108060.
- Kilpeläinen, J., Aphalo J., Lehto, T. (2020). Temperature affected the formation of arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas in *Populus angustifolia* seedlings more than a mild drought // Soil Biol. Biochem. 2020. V. 146. 107798.
- Kranabetter J., Mac-Kenzie W. Contrasts among mycorrhizal plant guilds in foliar nitrogen concentration and δ<sup>15</sup>N along productivity gradients of a Boreal forest // Ecosystems. 2010. V. 13. P. 108–117.
- Lang F., Kruger J., Amelung W., Willbold S., Frossard E., Bunemann E., Bauhus J., Nitschke R. et al. Soil phosphorus supply controls P nutrition strategies of beech forest ecosystems in Central Europe // Biogeochemistry. 2017. V. 136. P. 5–29.
- Lehto T., Zviade J. Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review // Mycorrhiza. 2011. V. 21. P. 71–90.
- Lilleskov E., Wargo P., Vogt K., Vogt D. Mycorrhizal fungal community relationship to root nitrogen concentration over a regional atmospheric nitrogen deposition gradient in the northeastern USA // Can. J. For. Res. 2008. V. 38. P. 1260–1266.
- Lin G., McCormack M., Ma C., Guo D. Similar below-ground carbon cycling dynamics but contrasting modes of nitrogen cycling between arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal forests // Ambio. 2016. V. 45(Suppl. 2). P. 175–187.
- Lindahl B., Tunlid A. Ectomycorrhizal fungi – potential organic matter decomposers, yet not saprotrophs // New Phytol. 2015. V. 205. P. 1443–1447.
- Lucas R., Casper B. Ectomycorrhizal community and extracellular enzyme activity following simulated atmospheric N deposition // Soil Biol & Biochem. 2008. V. 40. P. 1662–1669.
- Martin F., Harrison M., Lennon S., Lindahl B., Öpik M., Polle A., Requena N., Selosse M.-A. Cross-scale integration of mycorrhizal function // New Phytol. 2018. V. 220. P. 941–946.
- Michelsen A., Schmidt I., Jonasson S., Quarmby C., Sleep D. Leaf <sup>15</sup>N abundance of subarctic plant provides field evidence that ericoid ectomycorrhizal and non- and arbuscular mycorrhizal species different sources of soil nitrogen // Oecologia. 1996. V. 105. P. 53–63.
- Michelsen A., Quarmby C., Sleep D., Jonasson S. Vascular plant <sup>15</sup>N natural abundance in heath and forest tundra ecosystems is closely correlated with presence and type

- of mycorrhizal fungi in roots // *Oecologia*. 1998. V. 115. P. 406–418.
- Midgley M., Phillips R. Mycorrhizal associations of dominant trees influence nitrate leaching responses to N // *Biogeochemistry*. 2014. V. 117. P. 241–253.
- Nadelhoffer K., Aber J., Melillo J. Fine root, net primary production, and soil nitrogen availability: a new hypothesis // *Ecology*. 1985. V. 66. P. 1377–1390.
- Nehls U., Plassard C. Nitrogen and phosphate metabolism in ectomycorrhizas // *New Phytologist*. 2018. V. 220. P. 1047–1058.
- Nilsson L., Baath E., Falkengren-Grerup U., Wallander H. Growth of ectomycorrhizal mycelia and composition of soil microbial communities in oak forest soils: along a nitrogen deposition gradient // *Oecologia*. 2007. V. 153. P. 375–384.
- Orwin K.H., Kirschbaum M.U.F., St John M.G., Dickie I.A. Organic nutrient uptake by mycorrhizal fungi enhances ecosystem carbon storage: a model-based assessment // *Ecology Letters*. 2011. V. 14. P. 493–502.
- Pardo L., Semaoune P., Schaberg P., Eagar C., Sebilo M. Patterns in  $\delta^{15}N$  in roots, stems, and leaves of sugar maple and American beech seedlings, saplings, and mature trees // *Biogeochemistry*. 2013. V. 112. P. 275–291.
- Phillips L., Ward V., Jones M. Ectomycorrhizal fungi contribute to soil organic matter cycling in sub-boreal forests // *ISME J*. 2014. V. 8. P. 699–713.
- Pellitier P., Zak D. Ectomycorrhizal fungi and the enzymatic liberation of nitrogen from soil organic matter: why evolutionary history matters // *New Phytol*. 2018. V. 217. P. 68–73.
- Pickles B., Truong C., Watts-Williams S., Bueno C. Mycorrhizas for a sustainable world // *New Phytol*. 2020. V. 225. P. 1065–1069.
- Rasmussen A., Busby R., Hoeksema J. Host preference of ectomycorrhizal fungi in mixed pine–oak woodlands // *Can. J. For. Res.* 2018. V. 48. P. 153–159.
- Read D., Perez-Moreno J. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? // *New Phytol*. 2003. V. 157. P. 475–492.
- Robertson S., Taskaberry L., Egger K., Massicotte H. Ectomycorrhizal fungi communities of black spruce differ between wetland and upland forests // *Can. J. For. Res.* 2006. V. 36. P. 972–985.
- Rossi S., Bordoleau A., Houle D., Morin H. Effect of chronic ammonium nitrate addition on the ectomycorrhizal community in a black spruce stand // *Can. J. For. Res.* 2012. V. 42. P. 1204–1212.
- Rossow J., Bryant J., Kiellan K. Effects of above-ground browsing by mammals on mycorrhizal infection in an early successional taiga ecosystem // *Oecologia*. 1997. V. 110. P. 94–98.
- Sasaki T., Konno M., Hasegawa Y., Imaji A., Terabaru M., Nakamura R., Ohira N., Matsukura K., Seiwa K. Role of mycorrhizal associations in tree spatial distribution patterns based on size class in an old-growth forest // *Oecologia*. 2019. V. 189. P. 971–980.
- Scharlemann J.P., Tanner E.V., Hiederer R., Kapos V. Global soil carbon: understanding and managing the largest terrestrial carbon pool // *Carbon Management*. 2014. V. 5. P. 81–91.
- Shaver G., Chapin F. Production: biomass relationships and element cycling in contrasting arctic vegetation types // *Ecol. Monographs*. 1991. V. 61. P. 1–31.
- Simard S. Mycorrhizal networks and complex system: contributions of soil ecology science to managing climate change effects in forested ecosystems // *Can. J. For. Res.* 2009. V. 89. P. 369–382.
- Simard S., Beiler K., Bingham M., Deslippe J., Philip L., François P., Teste F. Mycorrhizal networks: mechanisms, ecology and modeling // *Fungal Biol. Reviews*. 2012. V. 26. P. 39–60.
- Smith G., Peay K. Stepping forward from relevance in mycorrhizal ecology // *New Phytol*. 2020. V. 226. P. 292–294.
- Smith A., Smith S. How harmonious are arbuscular mycorrhizal symbioses? Inconsistent concepts reflect different mindsets as well as results // *New Phytol*. 2015. V. 205. P. 1381–1384.
- Šnajdr J., Valášková V., Merhautová Vr., Herinková J., Cajthaml T., Baldrian P. Spatial variability of enzyme activities and microbial biomass in the upper layers of *Quercus petraea* forest soil // *Soil Biol Biochem*. 2008. V. 40. P. 2068–2075.
- Sponseller R., Gundale M., Futter M., Ring E., Nordin A., Nařholm T., Laudon H. Nitrogen dynamics in managed boreal forests: recent advances and future research directions // *Ambio*. 2016. V. 45. P. 175–187.
- Steidinger S., Crowther W., Liang J., Van Nuland E., Werner A., Reich B., Nabuurs J., De-Miguel S., Zhou M., Picard N. et al. Climatic controls of decomposition drive the global biogeography of forest-tree symbioses // *Nature*. 2019. T. 569. P. 404–408.
- Tanaka-Oda A., Kenzo T., Toriyama J., Matsuura Y. Variability in the growth rates and foliage  $\delta^{15}N$  values of black spruce trees across a slope gradient in the Alaskan // *Can. J. For. Res.* 2016. V. 46. P. 1483–1490.
- Van Geel M., Jacquemyn H., Peeters G., van Acker R., Honnay O., Ceulemans T. Diversity and community structure of ericoid mycorrhizal fungi in European bogs and heathlands across a gradient of nitrogen deposition // *New Phytol*. 2020. V. 228. P. 1640–1651.
- Wallander H., Goransson H., Rosengren U. Production, standing biomass and natural abundance of  $^{15}N$  and  $^{13}C$  in ectomycorrhizal mycelia collected at different soil depths in two forest types // *Oecologia*. 2004. V. 139. P. 89–97.
- Waller L., Felten J., Hiiesalu I., Vogt-Schilb H. Sharing resources for mutual benefit: crosstalk between disciplines deepens the understanding of mycorrhizal symbioses across scale // *New Phytol*. 2018. V. 217. P. 29–32.
- Wipf D., Krajinski F., van Tuinen D., Recorbet C., Courty P-E. Trading on the arbuscular mycorrhiza market: from arbuscules to common mycorrhizal networks // *New Phytol*. 2019. V. 223. P. 1127–1142.
- Wurzburger N., Hendrick R. Rhododendron thickets alter N cycling and soil extracellular enzyme activities in southern Appalachian hardwood forests. // *Pedobiologia*. 2007. V. 50. P. 563–576.
- Zak D., Pellitier P., Buck W., Lucas J., Nave E., Averill C., Beidler K., Bhatnagar J., Blesh J., Classen T. Exploring the role of ectomycorrhizal fungi in soil carbon dynamics // *New Phytol*. 2019. V. 223. P. 33–39.

## **Mycorrhizal Complexes and Their Role in the Ecology of Boreal Forests**

**S. M. Razgulin<sup>#</sup>**

*Institute of Forest Science RAS, st. Sovetskaya, 21, p. Uspenskoe, Odintsovsky District, Moscow Region, 143030 Russia*

*<sup>#</sup>e-mail: root@ilan.ras.ru*

The functioning of mycorrhizal associations in forest ecosystems is discussed. Mycorrhiza are involved in supplying plants with nutrients and improve their growth, but they can also inhibit plant development. The level of participation of ecto-ericoid mycorrhiza in the carbon cycle of boreal forests is considered to be very significant. According to isotope indications, the role of mycorrhiza in the nitrogen cycle is high in the tundra and less pronounced in boreal forests. Mycorrhiza are involved in the decomposition of soil OM to obtain available nitrogen, but the enzymatic mechanisms of this process and the pathways for the movement of *N* and *P* from fungal cells to plants are largely unknown. Mycorrhiza prevent nitrogen losses from forest soils during leaching. Mycorrhizal networks contribute to the processes of reforestation and structuring of plantations, protect against pathogens and pests.

*Keywords:* mycorrhizal symbioses, ecto-ericoid and arbuscular mycorrhiza, saprophytic microflora, soil organic matter, exozymes, nitrogen isotopes

КРАТКИЕ  
СООБЩЕНИЯ

УДК 597.553.2.: 575.86

АНАЛИЗ мтДНК ВЕРХНЕЕНИСЕЙСКОГО  
(*Thymallus svetovidovi*) И МОНГОЛЬСКОГО (*Thymallus brevirostris*) ХАРИУСОВ,  
УТОЧНЕНИЕ ИХ АРЕАЛОВ<sup>1</sup>

© 2022 г. Е. В. Пономарева\*, @, А. А. Волков\*\*, М. В. Пономарева\*, Е. А. Шубина\*\*\*

\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

\*\*ВНИИ рыбного хозяйства и океанографии, Окружной проезд, 19, Москва, 105187 Россия

\*\*\*НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва, 119991 Россия

@E-mail: kponom@mail.ru

Поступила в редакцию 04.03.2021 г.

После доработки 12.04.2022 г.

Принята к публикации 05.05.2022 г.

Проанализированы выборки хариусов из притоков Большого Енисея, Черного Иртыша и проведено их сравнение с монгольским хариусом *T. brevirostris* из реки Кобдо на основе двух фрагментов мтДНК (*CO1* и *CR*). Показано, что гаплотипы хариусов из Черного Иртыша относятся к монгольскому хариусу. На основе проведенного анализа сделан вывод, что в притоках Большого Енисея обитает верхнеенисейский хариус *T. svetovidovi*, обладающий низким генетическим разнообразием по сравнению с монгольским хариусом.

**Ключевые слова:** верхнеенисейский хариус, *T. svetovidovi*, монгольский хариус, *T. brevirostris*, *CO1*, *CR*, Большой Енисей, Черный Иртыш

**DOI:** 10.31857/S1026347022060130

Представители рода хариусов *Thymallus* (Cuvier, 1829) встречаются в большинстве водоемов Европейского Севера, Сибири и Дальнего Востока. Морфологические и систематические исследования хариусов имеют длительную историю, при этом систематика рода *Thymallus* неоднократно пересматривалась (Световидов, 1936; Берг, 1948; Froufe *et al.*, 2005; Weiss *et al.*, 2020 и др.). Наибольший теоретический интерес представляют хариусы в азиатской части ареала, что связано с большим разнообразием их форм. Несмотря на значительно увеличившееся количество исследований, из-за труднодоступности многих мест обитания хариусов еще недостаточно известно как о морфологических, биологических и генетических особенностях, так и о границах ареалов многих представителей этого рода.

Световидов в обзоре (1936) определял хариусов, обитающих на всем протяжении Енисея, включая и верховья, как один вид – сибирский хариус (*Thymallus arcticus* Pallas, 1776). В 1960–1970-х гг. Гундризер (1967, 1979) описал морфологические отличия хариусов из высокогорных озер Большого Енисея от сибирского хариуса и пред-

ложил выделить их в подвиды сибирского. В обзоре видов Монголии Котела (Kottelat, 2006) предположил, что в притоке Малого Енисея Шишкид Гол обитает вид, отличный от сибирского. Эти предположения были подтверждены генетическими исследованиями (Weiss *et al.*, 2020). При дальнейшем изучении хариусов из этого притока Книжин и Вайс (2009) на основе морфологических и морфометрических признаков описали новый вид *Thymallus svetovidovi*, (верхнеенисейский хариус). В российской части ареала подтверждений существования верхнеенисейского хариуса до настоящего времени не было получено.

Световидов (1936) полагал, что на всем протяжении Оби, как и в Енисее, обитает только сибирский хариус. Сейчас ареал сибирского хариуса в Оби ограничивается нижним течением реки (Romanov, 2017; Dyldin *et al.*, 2017). В китайской части верховьев Иртыша обитает монгольский хариус (Dyldin *et al.*, 2017). Монгольский хариус (*Thymallus brevirostris*) обитает в реках Центрально-Азиатского бассейна (Световидов, 1936; Берг, 1948; Kottelat, 2006). Впервые монгольский хариус был описан во второй половине XIX в., с тех пор его видовой статус большинством исследователей не подвергался сомнению.

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S1026347022060130 для авторизованных пользователей.



Рис. 1. Локализация выборок. Обозначения на карте-схеме: 1–2 – озера из притоков Большого Енисея, 3 – река Черный Иртыш (Казахстан), 4 – река Кобдо (Монголия).

Целью настоящего исследования было определение с помощью генетических маркеров видовой принадлежности хариусов, обитающих в верховьях Иртыша на территории Казахстана и в верховьях Енисея и сравнение с монгольским хариусом из реки Кобдо. В работе были проанализированы два участка мтДНК: контрольный регион (Д-петля, *CR*) и участок, кодирующий ген цитохромоксидазы субъединицы I (*COI*). Контрольный регион – это наиболее часто применяющийся во внутривидовых и межвидовых исследованиях хариусов (Froufe *et al.*, 2005; Weiss *et al.*, 2020). Участок *COI* был выбран как основной фрагмент, который используется в работах по паспортизации видов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Географическое расположение выборок показано на рис. 1, координаты и характеристики выборок – в табл. 1.

Выделение ДНК из плавников, фиксированных 96%-ным этанолом, проводили с использованием набора QIAGEN DNeasy™ (“QIAGEN”, Германия) по протоколу производителя. Для амплификации Д-петли использовали последовательности праймеров LRBT-25, LRBT-1195 (Uiblein *et al.*, 2001), для амплификации участка гена *COI* использовали последовательности универсальных праймеров *COI* для рыб (Ivanova *et al.*, 2007). Амплификацию проводили в 20 мкл смеси, содержащей: 2 мкл 10× *Taq*-буфера, 2,5 мМ Mg<sup>2+</sup>, 0,8 мМ

Таблица 1. Характеристика выборок и количество выявленных гаплотипов, *N* – объем выборок

| Вид                    | Водоем, приток, бассейн                           | Год  | Обозначение | Координаты          | <i>N</i> | Количество гаплотипов с учетом инделов |    |          |
|------------------------|---|------|-------------|---------------------|----------|--|----|----------|
|                        |   |      |             |                     |          | COI                                    | CR | CR + COI |
| <i>T. svetovidovi</i>  | Озеро без названия, река Маймамыш, Большой Енисей | 2016 | En_1        | 51.67305, 97.459849 | 14       | 1                                      | 2  | 2        |
| <i>T. svetovidovi</i>  | Озеро без названия, река Хан, Большой Енисей      | 2016 | En_2        | 51.64000, 97.047222 | 14       | 1                                      | 1  | 1        |
| <i>T. brevirostris</i> | Река Черный Иртыш, Иртыш, Обь                     | 2015 | Kaz         | 47.93067, 84.949812 | 4        | 1                                      | 2  | 2        |
| <i>T. brevirostris</i> | Река Кобдо, Центрально-Азиатский                  | 2006 | Mon         | 49.12000, 90.994450 | 31       | 6                                      | 12 | 16       |

каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 1 ед BioNУTaq ДНК полимеразы (“ДИАЛАТ”, Россия), 5 пкМ каждого праймера (“Синтол”, Россия), 1.0 мкл выделенной ДНК, до необходимого объема смесь доводили деионизованной водой. Амплификацию фрагментов проводили в следующем режиме: первичная денатурация – 95°C 5 мин, затем 35 циклов по: 20 с – 95°C, 30 с – 56°C (*CR*) или 52°C (*COI*), 1 мин – 72°C; заключительная элонгация 72°C – 10 мин. Для контроля ПЦР-продукта проводили горизонтальный гель-электрофорез, амплификат разделяли в 1.5%-ном агарозном геле. Очистку продуктов ПЦР проводили методом осаждения смесью ацетата аммония с 96%-ным этанолом с последующей промывкой 70%-ным этанолом. Для сиквенс-реакции использовали смесь терминаторов BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США), анализ нуклеотидной последовательности проводили в генетическом анализаторе ABI Prism 3500 (“Applied Biosystems”). Для секвенирования контрольного региона использовали внутренние праймеры (5'–3'): In(429)F – TCAACTAACACGAGCTCTGTCTCT; In(928)R – GGGGGTTTGTTCGAGTAGAAGCC; In(737)F – TCAGCTTGCATCTCACAGTG.

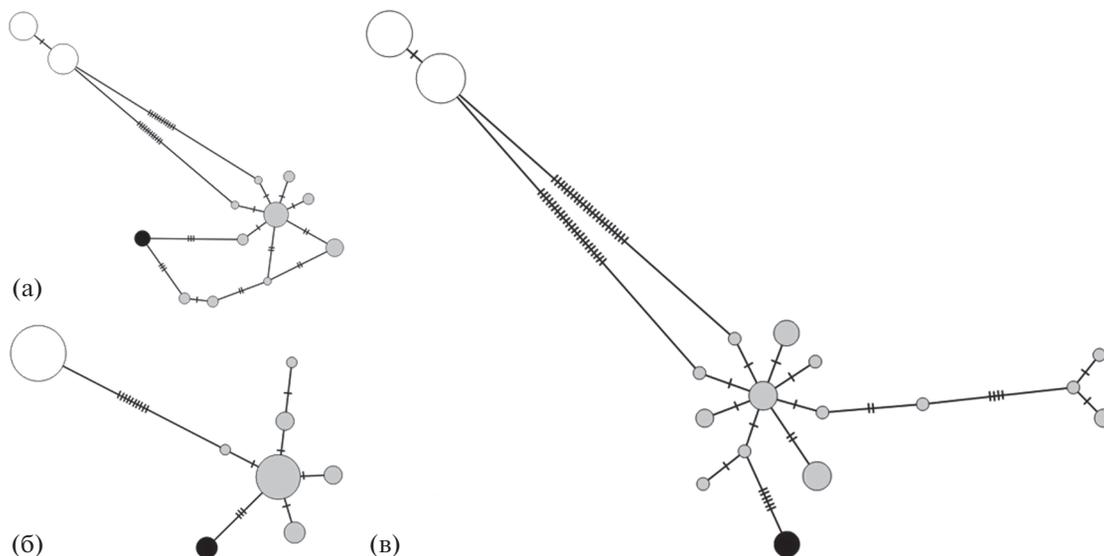
Первичную обработку и множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе Geneious® 6.0.5 (“Biomatters Ltd”), определение количества гаплотипов (H), разнообразия гаплотипов (Hd), разнообразия нуклеотидов (Pi) проводили в программах FaBox (Villesen, 2007), DnaSP v.5 (Librado, Rozas, 2009). Двухпараметрическая модель Кимуры K2P (Kimura, 1980) была применена для расчета матрицы попарных дистанций гаплотипов *COI*. Для построения дистанционных матриц использовали программу Mega X (Kumar *et al.*, 2018). Информационный критерий Акаике (AIC) был применен для определения наилучшей модели замен (Lefort *et al.*, 2017). Модель GTR + G + I (I = 0.665,  $\Gamma = 0.712$ ) была применена для построения деревьев: методом присоединения соседей (NJ) с бутстреп поддержкой (10 000 итераций) в программе Mega X (Kumar *et al.*, 2018), BioNJ дерево методом максимального правдоподобия в программе PhyML 3.0. (Guindon, Gascuel, 2003; Guindon *et al.*, 2010), методом байесовской статистики (цепочки длиной 400 000 генераций с отбрасыванием первых 10%) в программе MrBayes (Huelsenbeck, Ronquist, 2001) в плагине, встроенном в Geneious® 6.0.5. MSN алгоритм был использован для построения сети гаплотипов в программе PopArt (Bandelt *et al.*, 1999). График соответствия распределения частот попарных нуклеотидных различий модели экспансии вида построен в программе DnaSp v.5 (Librado, Rozas, 2009). Для оценки соответствия моделям численного и пространственного расширения вида (Rogers, Harpending, 1992) рассчитывали сумму

квадратичных отклонений (SSD) и индекс Харпендинга  $r$  (raggedness index), а также индексы, отражающие демографические события, Таджимы (D) и Фу ( $F_s$ ) в программе Arlequin v. 3.5.2.2 (Excoffier, Lischer, 2010). Для построения дерева гаплотипов и матрицы дистанций были использованы последовательности, депонированные в базе нуклеотидных последовательностей GenBank® (NCBI), содержащие исследованные участки мтДНК: NC012928 (*Thymallus thymallus*), NC012929 (*T. arcticus*), NC027409 (*Thymallus tugarinae*), NC027412 (*T. brevirostris*), KJ866482 (*Thymallus baicalolenensis*) KT867089 (*T. arcticus mertesii*), KU674353 (*Thymallus grubii flavomaculatus*). Полученные последовательности гаплотипов были депонированы в GenBank под номерами: MW036546 – MW036553; MW048650 – MW048665.

Для уточнения вопросов видовой принадлежности мы ориентировались на критерии, принятые в проекте паспортизации видов BOLD (Ratnasingham, Hebert, 2007).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После выравнивания был исследован участок гена *COI* (длиной 699 п. н.), всего было выявлено 17 вариабельных сайтов, из них 16 информативных, 15 транзиций и 2 трансверсии, все замены – синонимичные. Среди 62 исследованных последовательностей было выделено 8 гаплотипов, из них 6 гаплотипов у монгольского хариуса из реки Кобдо, 1 гаплотип у хариусов из Черного Иртыша, отличающийся на 3 замены от массового гаплотипа Mon\_1, и 1 гаплотип у хариусов из верховьев Енисея, отличающийся на 11 замен от массового гаплотипа Mon\_1 (табл. 1, рис. 2б, прил. 1). После выравнивания 60 последовательностей, в проанализированном участке длиной 1066 п. н., содержащем полную последовательность контрольного региона (*CR*) мтДНК, было выявлено 22 вариабельных информативных сайта, из них 18 транзиций и 4 трансверсии. Всего было выделено 16 гаплотипов с инделами и 13 без инделов, из них 12 гаплотипов с инделами принадлежали *T. brevirostris*, 5 из них были выявлены впервые. Два новых гаплотипа (Kaz\_1 и Kaz\_2), отличающихся на 3 замены от гаплотипов из реки Кобдо, выделили у рыб из реки Черный Иртыш (табл. 1, рис. 2а, прил. 1). Один из гаплотипов хариусов из Верхнего Енисея совпал с последовательностями *CR* из Генбанка (EU676291, -2, -4), принадлежавшими *T. svetovidovi* из Шишкид Гол, второй гаплотип – новый, все гаплотипы отличались на одну замену – транзицию. После объединения двух фрагментов (*COI* + *CR*) и выравнивания участка длиной 1765 п. н. было выявлено 20 гаплотипов с инделами (табл. 1). Параметры генетического разнообразия были значительно выше для монгольского хариуса, чем для верхнеенисейского (табл. 2).



**Рис. 2.** MST сеть гаплотипов *T. brevirostris* (серый – р. Кобдо, черный – р. Черный Иртыш), *T. svetovidovi* (белый). Насечки – количество замен между гаплотипами, диаметры пропорциональны количеству гаплотипов. (а) – CR мтДНК, (б) – COI мтДНК, (в) – объединенные фрагменты мтДНК CR + COI.

В структуре сетей гаплотипов монгольского хариуса прослеживается звездообразная топология (рис. 2), наиболее четко такая структура сети выявляется по гену *COI* с центральным наиболее часто встречающимся гаплотипом Mon\_1 (рис. 2б). При построении деревьев разными методами топология основных узлов сохранялась (рис. 3). Гаплотипы, полученные из выборки Черного Иртыша, образовали внутреннюю ветвь в кластере монгольского хариуса (рис. 3). Гаплотипы верхнеенисейского хариуса образуют сестринскую ветвь по отношению к монгольскому с максимальной поддержкой (100/1/1) в узле ветвления, ближайшую ветвь к кластеру монгольско-верхнеенисей-

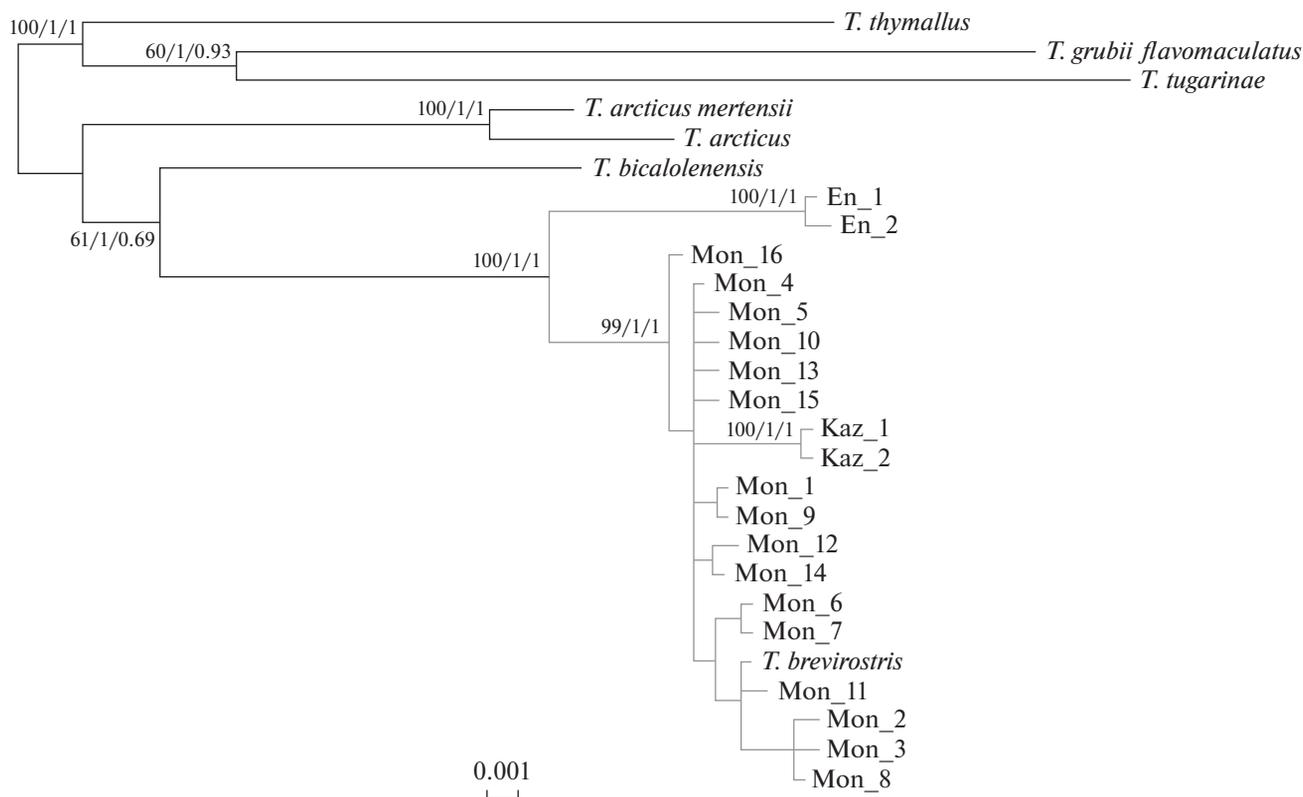
ского хариусов образует байкалоленский хариус (*T. baicalolenensis*) (рис. 3).

В матрице дистанций К2Р по баркодинговому участку гена *COI* наибольшая дистанция (0.064) была между *T. tugarinae* и *T. thymallus*, наименьшие дистанции (0.006) – между *T. arcticus* и *T. arcticus mertensii* и между *T. brevirostris* и *T. brevirostris* (Kaz), дистанция между *T. brevirostris* и *T. svetovidovi* – 0.017 (табл. 3).

На диаграмме распределения частот попарных различий гаплотипов монгольского хариуса наблюдается бимодальное распределение (рис. 4). Расчет индексов популяционной экспансии для монгольского хариуса –  $SSD = 0.0132$  ( $P > 0.05$ ),

**Таблица 2.** Характеристики генетического разнообразия *T. brevirostris* и *T. svetovidovi* на основе фрагментов мтДНК, n – количество исследованных образцов, h – количество гаплотипов, s – число сегрегирующих сайтов, k – среднее число нуклеотидных различий, Pi – нуклеотидное разнообразие, Hd ± SD – разнообразие гаплотипов и стандартное отклонение

| Участки мтДК | Вид                    | n  | h  | s  | k      | Pi      | Hd ± SD       |
|--------------|------------------------|----|----|----|--------|---------|---------------|
| COI          | <i>T. brevirostris</i> | 34 | 7  | 8  | 1.429  | 0.0024  | 0.722 ± 0.073 |
|              | <i>T. svetovidovi</i>  | 28 | 1  | 0  | –      | –       | –             |
|              | Всего                  | 62 | 8  | 17 | 6.206  | 0.00888 | 0.708 ± 0.045 |
| CR           | <i>T. brevirostris</i> | 30 | 14 | 11 | 2.645  | 0.00249 | 0.867 ± 0.041 |
|              | <i>T. svetovidovi</i>  | 28 | 2  | 1  | 0.516  | 0.00048 | 0.516 ± 0.029 |
|              | Всего                  | 60 | 16 | 22 | 8.322  | 0.00786 | 0.859 ± 0.024 |
| COI + CR     | <i>T. brevirostris</i> | 31 | 18 | 19 | 4.06   | 0.00231 | 0.927 ± 0.024 |
|              | <i>T. svetovidovi</i>  | 28 | 2  | 1  | 0.516  | 0.00029 | 0.516 ± 0.029 |
|              | Всего                  | 59 | 20 | 39 | 14.528 | 0.00826 | 0.873 ± 0.026 |



**Рис. 3.** Дерево гаплотипов, построенное на основе объединенных последовательностей *CR* и *CO1* мтДНК. Значения бутстреп поддержки и вероятности указаны в соответствующих узлах. Mon – гаплотипы *T. brevirostris* из р. Кобдо, Kaz – *T. brevirostris* из р. Черный Иртыш, En – *T. svetovidovi* из р. Большой Енисей.

$r = 0.0185$  ( $P > 0.05$ ),  $D = -0.504$  ( $P > 0.05$ ),  $FS = -7.3998$  ( $P < 0.01$ ), суммарно эти значения указывают на численную экспансию вида.

В данном исследовании для большинства попарных сравнений дистанции между видами хариусов выше, чем 0.027 (табл. 3). Рассчитанные попарные дистанции были ниже формальных для вида (1%) для двух сравнений: пары *T. brevirostris* из реки Кобдо и *T. brevirostris* (Kaz) из Черного Иртыша; пары *T. arcticus* и *T. arcticus mertensii* – по

0.006 (табл. 3). При этом гаплотипы хариусов из реки Черный Иртыш находятся внутри кластера гаплотипов монгольского хариуса и не формируют внешнюю самостоятельную ветвь на дендрограмме (рис. 3). Таким образом, на основе анализа мтДНК выборки из Черного Иртыша относятся к монгольскому хариусу *T. brevirostris*.

Анализ мтДНК выборок из притоков Верхнего Енисея показал, что выявленные гаплотипы были идентичны или отличались на одну замену от

**Таблица 3.** Матрица средних попарных дистанций Кимуры (K2P) между гаплотипами *CO1*. *T. brevirostris* (Kaz) – хариус из реки Черный Иртыш (Казахстан)

|   |                                 |       |       |       |       |       |       |       |       |
|---|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | <i>T. svetovidovi</i>           | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     |
| 2 | <i>T. brevirostris</i>          | 0.017 |       |       |       |       |       |       |       |
| 3 | <i>T. brevirostris</i> (Kaz)    | 0.017 | 0.006 |       |       |       |       |       |       |
| 4 | <i>T. baicalolenensis</i>       | 0.034 | 0.027 | 0.028 |       |       |       |       |       |
| 5 | <i>T. arcticus mertensii</i>    | 0.042 | 0.035 | 0.032 | 0.028 |       |       |       |       |
| 6 | <i>T. grubii flavomaculatus</i> | 0.051 | 0.051 | 0.049 | 0.043 | 0.048 |       |       |       |
| 7 | <i>T. thymallus</i>             | 0.043 | 0.046 | 0.046 | 0.042 | 0.043 | 0.051 |       |       |
| 8 | <i>T. arcticus</i>              | 0.041 | 0.038 | 0.035 | 0.028 | 0.006 | 0.048 | 0.043 |       |
| 9 | <i>T. tugarinae</i>             | 0.063 | 0.057 | 0.057 | 0.048 | 0.054 | 0.052 | 0.064 | 0.057 |

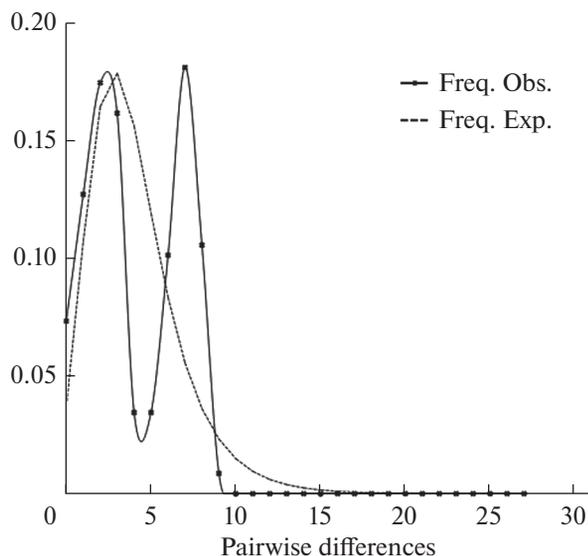


Рис. 4. График соответствия распределения частот попарных нуклеотидных различий *T. brevirostris* модели экспансии вида.

уже известных для этого вида. При этом, для верхнеенисейского хариуса известно экстремально низкое число гаплотипов: только три гаплотипа, вместе с полученными в нашей работе. Все это свидетельствует об “эффекте основателя” и “бутылочном горлышке”, т.е. значительном сокращении вида и происхождении от небольшого количества предков после разделения ареалов с монгольским хариусом и относительно недавнем формировании вида.

В выборке монгольского хариуса выявлен высокий уровень генетического разнообразия (табл. 1, 2), и при сопоставимом с верхнеенисейским объеме выборки у исследованных рыб было выявлено значительно большее количество гаплотипов. При этом звездообразная топология сети гаплотипов, особенно по *COI* (рис. 3), и соответствие рассчитанных параметров модели численной экспансии вида (рис. 4) свидетельствуют о произошедшем в прошлом сокращении, а затем увеличении численности монгольского хариуса. В исследованных нами выборках хариусов показатели генетического разнообразия были почти в полтора-два раза выше для контрольного региона, чем для фрагмента *COI* (табл. 2). При этом количество замен между гаплотипами монгольского и верхнеенисейского хариусов по обоим фрагментам были сопоставимы (рис. 2). Рассчитанная в нашем исследовании дистанция между верхнеенисейским и монгольским хариусами составила 0.017 и совпала с дистанциями, полученными на основе *CR* в работе Вайса с коллегами Weiss *et al.*, 2020, что выше, чем формальные внутривидовые границы. Кроме того, высокий уровень поддерж-

ки в узле ветвления монгольского и верхнеенисейского хариусов подтверждает хорошее разделение этих видов.

Таким образом, анализ мтДНК выборок хариуса из притоков Большого Енисея показал обитание верхнеенисейского хариуса в российской части ареала. В верховьях Оби (река Черный Иртыш, Казахстан) подтверждено обитание монгольского хариуса.

**Благодарности.** Авторы искренне признательны О.О. Колачевской, Н.В. Гордеевой и Г. Шалгимбаевой за помощь в сборе материала.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Берг Л.С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран. 4-е изд. Ч. 1. М.; Л.: Изд-во Акад. наук СССР, 1948. 465 с.
- Гундризер А.Н. О новом подвиде сибирского хариуса из бассейна Большого Енисея // Учен. зап. /Том. ун-т/. 1967. Вып. 53: Биология и почвоведение. С. 79–94.
- Гундризер А.Н. Зубастый сибирский хариус — *Thymallus arcticus* Dentatus Subsp. Nova // Новые данные о фауне и флоре Сибири. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1979. С. 15–22.
- Книжин И.Б., Вайс С.Дж. Новый вид хариуса *Thymallus svetovidovi* sp. nova (*Thymallidae*) из бассейна Енисея и его положение в роде *Thymallus* // Вопросы ихтиологии. 2009. Т. 49. № 1. С. 5–14.
- Световидов А.Н. Европейско-азиатские хариусы (genus *Thymallus* Cuvier) // Тр. Зоол. ин-та АН СССР. 1936. Т. 3. С. 183–301.
- Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. P. 37–48.
- Dyldin Yu.V., Hanel L., Romanov V.I., Plesnik J. A review of the genus *Thymallus* (Pisces: Salmoniformes, Salmonidae, Thymallinae) with taxonomic notes // Bulletin Lampetra. 2017. V. 8. P. 103–126.
- Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. // System. Biology. 2010. V. 59. Iss. 3. P. 307–321.
- Guindon S., Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood // System. Biology. 2003. V. 52. P. 696–704.
- Excoffier L., Lischer H.E. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Mol. Ecol. Res. 2010. V. 10. P. 564–567.
- Froufe E., Knizhin I., Weiss S. Phylogenetic analysis of the genus *Thymallus* (grayling) based on mtDNA control region and ATPase 6 genes, with inferences on control region constraints and broad-scale Eurasian phylogeography // Mol. Phylogen. Evol. 2005. V. 34. P. 106–117.
- Ivanova N., Zemlyak T., Hanner R., Hebert P. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding // Mol. Ecol. Notes. 2007. V. 7. P. 544–548.

- Kimura M.* A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // *J. Mol. Evol.* 1980. V. 16. P. 111–120.
- Kottelat M.* Fishes of Mongolia: a check-list of the fishes known to occur in Mongolia with comments on systematics and nomenclature. World Bank Report (NE-MO). Washington, D.C.: World Bank Group, 2006. 103 p.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.* 2018. V. 35. P. 1547–1549.
- Lefort V., Longueville J.-E., Gascuel O.* SMS: Smart Model Selection in PhyML // *Mol. Biol. Evol.* 2017. V. 34. Iss. 9. P. 2422–2424.
- Librado P., Rozas J.* DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // *Bioinformatics.* 2009. V. 25. P. 1451–1452.
- Ratnasingham S., Hebert P.D.N.* BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). // *Mol. Ecol. Notes.* 2007. V. 7. P. 355–364.
- Rogers A.R., Harpending H.* Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences // *Mol. Biol. Evol.* 1992. V. 9. P. 552–569.
- Romanov V.I.* On the taxonomic composition of the graylings (*Thymallidae*) from the Ob and Yenisei River Basins // *Intern. J. Environ. Studies.* 2017. V. 74. P. 845–853.
- Uiblein F., Jagsch A., Honsig-Erlenburg W., Weiss S.* Status, habitat use, and vulnerability of the European grayling in Austrian waters // *J. Fish Biology.* 2001. V. 59. P. 223–247.
- Villesen P.* FaBox: an online toolbox for fasta sequences // *Mol. Ecol. Notes.* 2007. V. 7. Iss. 6. P. 965–968.
- Weiss S., Grimm J., Gonçalves D.V., Secci-Petretto G., Englmaier G.K., Baimukanov M., Froufe E.* Comparative genetic analysis of grayling (*Thymallus* spp. Salmonidae) across the paleohydrologically dynamic river drainages of the Altai-Sayan mountain region // *Hydrobiologia.* 2020. V. 847. P. 2823–2844.

## mtDNA Analysis of the Upper Yenisei (*Thymallus svetovidovis*) and Mongolian (*Thymallus brevirostris*) Graylings, Clarification of Their Ranges

E. V. Ponomareva<sup>1, #</sup>, A. A. Volkov<sup>2</sup>, M. V. Ponomareva<sup>1</sup>, and E. A. Shubina<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

<sup>2</sup> Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow, 105187 Russia

<sup>3</sup> Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology MSU, Moscow, 119991 Russia

<sup>#</sup> e-mail: kponem@mail.ru

Samples of graylings from the tributaries of the Great Yenisei and of the Black Irtysh were analyzed and compared with the Mongolian grayling *T. brevirostris* from the Khovd River based on two mtDNA fragments (*COI* and *CR*). It was shown that haplotypes of graylings from the Black Irtysh belong to the Mongolian grayling. Based on the analysis, it was concluded that the Upper Yenisei grayling *T. svetovidovi* inhabiting the tributaries of the Greater Yenisei has lower genetic diversity than the Mongolian grayling.

**Keywords:** Upper Yenisei grayling, *T. svetovidovi*, Mongolian grayling, *T. brevirostris*, *COI*, *CR*, the Great Yenisei, the Black Irtysh