

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 504, 2022

---

---

- Исследование распределения магнитных наночастиц в опухолевых тканях методом сканирующей магнитно-силовой нанотомографии  
*О. И. Агапова, А. Е. Ефимов, К. Е. Мочалов, Д. О. Соловьева, Е. В. Свищевская, С. М. Климентов, А. А. Попов, В. А. Олейников, И. И. Агапов, С. В. Готье* 219
- Локализация механизмов амплитудно-частотной модуляции пульсового кровенаполнения микрососудистого русла мягких тканей. Пилотное исследование  
*А. А. Гриневич, Б. Г. Гарамян, Н. К. Чемерис* 223
- Полиметаллический стресс изменяет эндогенный статус brassinosterоидов и снижает эффективность фотохимических реакций фотосистемы II у растений ячменя  
*Е. Д. Данилова, Р. П. Литвиновская, И. Е. Злобин, Л. В. Коломейчук, О. К. Мурган, А. Л. Савчук, В. А. Хрипач, В. В. Кузнецов, М. В. Ефимова* 229
- Прямое свидетельство смены моляриформных зубов у *Gobiconodon borissiakii* (Gobiconodontidae, Mammalia) из раннего мела Монголии  
*А. В. Лопатин* 235
- Состояние почвенных гелей при разной пробоподготовке к вискозиметрии образцов дерново-подзолистой почвы  
*С. А. Шоба, Д. И. Потапов, И. В. Горепекин, Д. А. Ушкова, Т. А. Грачева, Г. Н. Федотов* 240
- Находка яиц гельминтов *Toxocara* в копролитах гиены *Pachycrocuta brevirostris* из плейстоцена пещеры Таврида (Крым)  
*Т. Н. Сивкова, Д. Р. Хантемиров, Д. О. Гимранов, А. В. Лавров, А. В. Кочнев* 245
- 
-

# CONTENTS

---

---

Vol. 504, 2022

---

---

Investigation of the Distribution of Magnetic Nanoparticles in Tumor Tissues  
by the Method of Scanning Magnetic Force Nanotomography

*O. I. Agapova, A. E. Efimov, K. E. Mochalov, D. O. Solovyeva, E. V. Svirshchevskaya,  
S. M. Klimentov, A. A. Popov, V. A. Oleinikov, I. I. Agapov, and S. V. Gautier* 219

Localization of Mechanisms of Amplitude-frequency Modulation of Pulse Blood Perfusion  
of the Soft tissue Microvasculature. Pilot Study

*A. A. Grinevich, B. G. Gharamyan, and N. K. Chemeris* 223

Polymetallic Stress Changes the Endogenous Status of Brassinosteroids and Reduces the Effectiveness  
of Photochemical Reactions Photosystem II in Barley Plants

*E. D. Danilova, R. P. Litvinovskaya, I. E. Zlobin, L. V. Kolomeichuk, O. K. Murgan,  
A. L. Sauchuk, V. A. Khripach, V. V. Kuznetsov, and M. V. Efimova* 229

Direct Evidence of the Molariform Tooth Replacement in *Gobiconodon borissiaki*  
(Gobiconodontidae, Mammalia) from the Early Cretaceous of Mongolia

*A. V. Lopatin* 235

State of Soil Gels Under Different Preparation of Samples of Soddy-podzolic Soil for Viscometry

*S. A. Shoba, D. I. Potapov, I. V. Gorepekin, D. A. Ushkova, T. A. Gracheva, and G. N. Fedotov* 240

Evidence of *Toxocara* Eggs in *Pachycrocuta brevirostris* (Gervais, 1850) Coprolites  
from the Pleistocene of Taurida Cave (Crimea)

*T. N. Sivkova, D. R. Khantemirov, D. O. Gimranov, A. V. Lavrov, and A. V. Kochnev* 245

---

---

УДК 57.01

## ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЯХ МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ МАГНИТНО-СИЛОВОЙ НАНОТОМОГРАФИИ

© 2022 г. О. И. Агапова<sup>1</sup>, А. Е. Ефимов<sup>1</sup>, К. Е. Мочалов<sup>2</sup>, Д. О. Соловьева<sup>2</sup>, Е. В. Свирщевская<sup>2</sup>,  
С. М. Климентов<sup>3</sup>, А. А. Попов<sup>3</sup>, В. А. Олейников<sup>2,3</sup>, И. И. Агапов<sup>1,\*</sup>, академик РАН С. В. Готье<sup>1,4</sup>

Поступило 25.12.2021 г.

После доработки 20.01.2022 г.

Принято к публикации 20.01.2022 г.

Развитие эффективных биомедицинских технологий с применением магнитных наночастиц (МНЧ) для задач онкотерапии и нанодиагностики требует разработки и внедрения новых методов для анализа микро- и наномасштабных распределений МНЧ в объеме клеток и тканей. В работе представлен новый подход к трехмерному анализу распределений МНЧ – сканирующая магнитно-силовая нанотомография в применении к исследованиям опухолевых тканей. Коррелятивная реконструкция распределений МНЧ и особенностей наноструктуры исследуемых тканей позволила выполнить количественную оценку параметров трехмерных распределений композитных наночастиц на основе кремния и оксида железа, полученных методом фемтосекундной лазерной абляции и введенных внутривенно и интратуморально в образцы опухолевых тканей меланомы мышцы V16/F1. Разработанная технология с использованием принципов сканирующей зондовой нанотомографии применима для исследования особенностей трехмерных микро- и наномасштабных распределений МНЧ в биоматериалах, клетках и тканях различных типов.

**Ключевые слова:** сканирующая зондовая нанотомография, магнитные наночастицы, опухолевые ткани, гипертермия, магнитно-силовая микроскопия

**DOI:** 10.31857/S2686738922030027

Твердотельные наноматериалы обладают уникальными физическими свойствами [1–3], которые могут быть эффективно использованы в биомедицинской диагностике и терапии [4–6]. В

частности, одним из перспективных методов лечения онкологических заболеваний является магнитная гипертермия, основанная на разогреве пораженного органа до температуры выше 42°C [7, 8]. Хорошо установлено, что поддержание такой температуры в течение 20–30 мин приводит к некрозу раковых клеток, более подверженных влиянию повышенной температуры, чем нормальные ткани. Преимущества использования магнитных наночастиц (МНЧ) в магнитной гипертермии связаны с тем, что ансамбли суперпарамагнитных наночастиц способны обеспечить чрезвычайно большие значения удельного поглощения энергии, порядка 1 кВт на грамм вещества, а также с тем, что в силу малых размеров наночастицы могут глубоко проникать в биологические клетки, ткани и органы. С помощью магнитных полей с большим градиентом функционализированные наночастицы могут быть собраны в нужной области тела (магнитофекция) для направленного терапевтического воздействия, либо отфильтрованы из среды для последующего химического анализа захваченных на их поверхностях молекул [9].

Вместе с тем многие вопросы, связанные с применением магнитных наночастиц в биомеди-

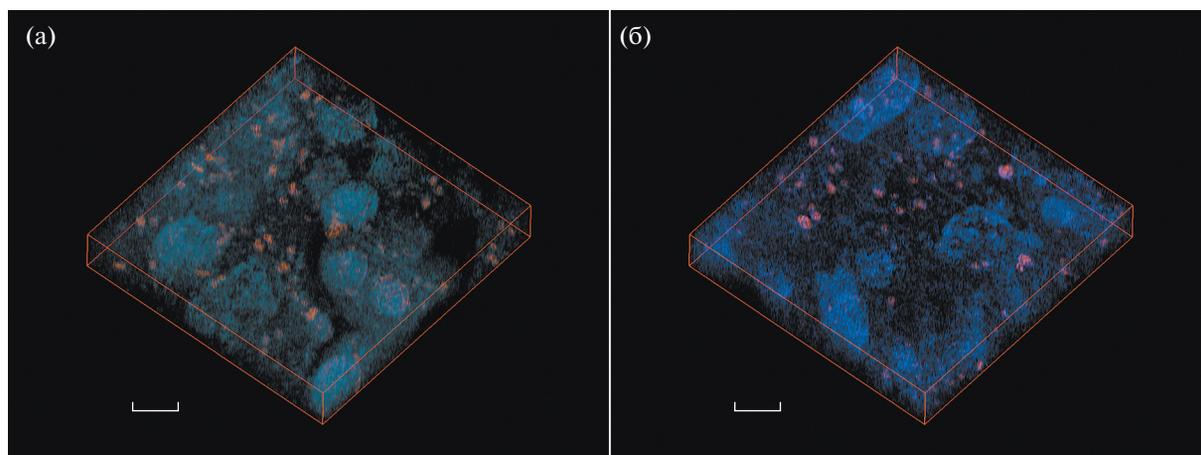
<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Национальный исследовательский ядерный университет “МИФИ”, Москва, Россия

<sup>4</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова” Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), Москва, Россия

\*e-mail: igor\_agapov@mail.ru



**Рис. 1.** Совмещенные трехмерные реконструкции методами СЗНТ (в режиме отображения фазы) и СМСНТ фрагментов опухолевых тканей В16/Ф1 с SiFe МНЧ, введенными (а) внутривенно и (б) интратуморально. Красные участки соответствуют МНЧ.  $30 \times 30 \times 4.6$  мкм, толщина среза 230 нм, масштабный отрезок 5 мкм.

цине, все еще ждут своего решения. Например, необходимо обеспечить достаточно однородное биораспределение наночастиц в пораженном органе. На практике, пока весьма трудно оценить полученное в результате инъекций стационарное распределение наночастиц внутри опухоли и оценить их общую стационарную концентрацию, так как распределение наночастиц заметно варьируется в зависимости от органа и типа биологического материала и существенно зависит от архитектуры кровеносных сосудов в области воздействия. Аналогичные задачи возникают и при изучении локализации биосенсоров на основе МНЧ в анализируемых клетках и тканях с наноразмерным разрешением [10].

Для всестороннего изучения взаимодействия МНЧ с клетками и тканями *in vivo* необходимы разработка и внедрение новых технологических подходов для анализа микро- и наноструктурных распределений МНЧ в их составе, а также количественной оценки параметров взаимодействия клеток с МНЧ на микро- и наноуровне.

Используемые для подобных исследований в настоящий момент различные варианты микроскопии, такие как электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия и оптическая микроспектроскопия высокого разрешения, не позволяют одновременно определять положение частиц в объеме ткани с требуемой точностью и оценивать их магнитные свойства.

Нами разработана уникальная технология сканирующей оптической зондовой нанотомографии (СОЗНТ), комбинирующая ультрамикротом и сканирующий зондовый микроскоп (СЗМ) [11]. Использование методики СОЗНТ позволяет изучать трехмерную микро- и наноструктуру биополимерных материалов, в корреляции с исследованием локализации МНЧ в объеме изучаемых об-

разцов и идентификации их магнитных свойств при помощи метода магнитной силовой микроскопии (МСМ) [12]. Однако исследования трехмерных распределений МНЧ в биологических клетках и тканях ранее не проводились.

Ниже представлены исследования распределений магнитных НЧ, введенных внутривенно и интратуморально в образцы опухолевых тканей меланомы мыши В16/Ф1.

Суспензии композитных наночастиц на основе кремния и оксида железа были получены методом фемтосекундной лазерной абляции в ацетоне и воде. Для получения наночастиц мишень из силицида железа  $\text{FeSi}_2$  (соотношение материалов в мишени Si:Fe 60%:40%) облучалась лазерным излучением (длина волны 1030 нм, длительность импульсов 270 фс, энергия импульсов 30 Дж, частота повторения импульсов 100 кГц, диаметр пучка 3 мм, модель лазера ТЕТА 10, Авеста, Россия). В ходе эксперимента были получены три фракции МНЧ различного размера, средние диаметры частиц в которых составляли 125, 55 и 32 нм.

Измерения магнитных свойств полученных МНЧ свидетельствуют о значительном росте магнитной восприимчивости и появлении слабого магнитного гистерезиса в полученных образцах фракции МНЧ со средним диаметром 55 нм. Все это указывает на наличие суперпарамагнитных свойств полученных МНЧ. Одновременно в экспериментах *in vitro* была замечена возможность управления накоплением таких МНЧ в водных средах за счет приложения градиента относительно слабого внешнего магнитного поля ( $\sim 0.1$  Тл).

Клетки В16/Ф1 выращивали в среде RPMI-1640 с добавлением 7% фетальной телячьей сыворотки (HyClone, США), пенициллин-стрептомицина и L-глутамина. Все клетки пассировали пу-

**Таблица 1.** Параметры реконструированных трехмерных распределений МНЧ в опухолевых тканях

Исследуемый образец	Параметр	Значение
Опухоль В16/F1, внутривенное введение МНЧ	$V_{tot}$ , мкм <sup>3</sup>	30 × 30 × 4.6
	$N$ , ед	297
	$r$ , %	0.35
	$d$ , нм	470 ± 154
Опухоль В16/F1, интратуморальное введение МНЧ	$V_{tot}$ , мкм <sup>3</sup>	30 × 30 × 4.6
	$N$ , ед	161
	$r$ , %	0.2
	$d$ , нм	485 ± 169

тем трипсинизации с помощью раствора трипсин/ЭДТА (ПанЭко, Москва). Для анализа распределения наночастиц в ткани опухоли мышам линии C57BL/6 переживали опухолевые клетки меланомы мышцы В16/F1 и в количестве 1 млн клеток на мышь. При достижении размера опухоли 200–400 мм<sup>3</sup> одной группе мышей вводили внутривенно наночастицы размером 55 нм в количестве 300 мкг/мышь, а другой группе – интратуморально (непосредственно в опухоль) в той же дозе. Мышей вывели из эксперимента через сутки, забирали опухоль и фиксировали ее в 4% параформальдегида.

В ходе получения образцов для исследований методом сканирующей магнитно-силовой нанотомографии (СМСНТ) производили дегидратацию образцов опухолевых тканей проводкой по спиртам с увеличивающейся концентрацией и заливку образцов в эпоксидную среду [13].

Далее проводили ультрамикротомирование образцов с помощью ультрамикротом Reichert-Jung Ultracut с алмазным ножом Diatome AFM 2.0 mm, входящим в состав установки СОЗНТ. Данная уникальная научная установка – система зондово-оптической 3D-корреляционной микроскопии (<http://skp-rf.ru/usu/486825/>), созданная с участием авторов настоящей работы, – позволяет выполнять серийные СЗМ-измерения наноструктуры поверхности объектов непосредственно после последовательных сверхтонких срезов образца ультрамикротомом [13]. Для каждого образца было выполнено 20 срезов с шагом 230 нм. Измерения с использованием СЗМ-зондов с магнитным покрытием проводились на поверхности образца после каждого среза. Каждое измерение выполнено двухпроходной методикой: в первом проходе измеряется топография поверхности, во втором – магнитные характеристики. Для более детального изображения клеточной структуры использовали режим отображения фазы. После получения серии коррелятивных 2D МСМ и фазовых изображений восстанавливали 3D структуру фрагмента образца при помощи программного

пакета Image Pro Plus 6.0 3DConstructor (Media Cybernetics Inc.). Предварительно каждое фазовое изображение объединяли с МСМ изображением для локализации МНЧ.

На рис. 1 приведены изображения фрагментов образцов опухолевых тканей В16/F1 с SiFe МНЧ, введенными внутривенно и интратуморально. Совокупность данных, полученных в результате трехмерной реконструкции методом СМСНТ, дает возможность вычислить ряд количественных параметров изучаемых распределений МНЧ, таких как общий объем восстановленной структуры  $V_{tot}$ , число кластеров в восстановленном объеме  $N$ , доля объема кластеров от общего объема  $r$ , средний размер кластеров  $d$ .

Параметры, полученные в результате анализа трехмерных реконструкций представлены в табл. 1.

Из полученных данных следует, что число  $N$  и доля объема кластеров от общего объема  $r$  кластеров МНЧ заметно (практически в 2 раза) ниже для случая интратуморального введения МНЧ. Стоит отметить, что, помимо кластеров МНЧ, в клетках имеются и отдельные МНЧ, причем локализируются они преимущественно в области ядер клеток, в отличие от кластеров, которые находятся в объеме клеток.

Разработанная технология исследования трехмерных характеристик наномасштабных распределений МНЧ с использованием принципов сканирующей магнитно-силовой нанотомографии применима для задач исследования особенностей взаимодействия МНЧ с клетками и тканями различных типов.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00171) в части получения МНЧ и выполнения экспериментов *in vivo*.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Canham L.T.* Silicon quantum wire array fabrication by electrochemical and chemical dissolution of wafers. // *Appl. Phys. Lett.* 1990. V. 57. P. 1046–1048.
2. *Cao G., Wang Y.* Nanostructures and Nanomaterials. Synthesis, Properties, and Applications, World Scientific Series in Nanoscience and Nanotechnology: V. 2. 2nd Edition, World Sci. Publ., 2011, 596 p.
3. *Ischenko A.A., Fetisov G.V., Aslanov L.A.* Nanosilicon: Properties, Synthesis, Applications, Methods of Analysis and Control, CRC Press, USA. 2014. 755 p.
4. *Lal S., Clare S.E., Halas N.J.* Nanoshell-enabled photothermal cancer therapy: impending clinical impact // *Acc. Chem. Res.* 2008. V. 41 № 12. P. 1842–1851.
5. *Kabashin A., Evans P., Pastkovsky S. et al.* Plasmonic nanorod metamaterials for biosensing. // *Nature Mater.* 2009. V. 8. P. 867–871.
6. *Kabashin A.V., Timoshenko V.Yu.* What theranostic applications could ultrapure laser-synthesized Si nanoparticles have in cancer? // *Nanomedicine.* 2016. V. 11. №17. P. 2247–2250.
7. *Ortega D., Pankhurst Q.A.* Magnetic hyperthermia. Nanoscience: V.1: Nanostructures through Chemistry. P. O'Brien, Ed., Royal Society of Chemistry: Cambridge. 2013. P. 60–88.
8. *Riegler J., Liew A., Hynes S.O., et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticle targeting of MSCs in vascular injury. // *Biomaterials.* 2013. V. 34. №8. P. 1987–1994.
9. *Zanini L.F., Dempsey N.M., Givord D., et al.* Autonomous micro-magnet based systems for highly efficient magnetic separation. // *Appl. Phys. Lett.* 2011. V. 99. P. 232504.
10. *Wu M., Huang S.* Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis, drug delivery and treatment. // *Mol. Clin. Oncol.* 2017. V. 7. P. 738–746.
11. *Efimov A.E., Agapov I.I., Agapova O.I., et al.* A novel design of a scanning probe microscope integrated with an ultramicrotome for serial block-face nanotomography. // *Review of Scientific Instruments.* 2017. V. 88. P. 023701.
12. *Mochalov K.E., Agapova O.I., Generalova A.N., et al.* Nanoscale Correlation Analysis of the Morphological, Optical, and Magnetic Structure of Polymer Microspheres for Multiplex Diagnostics // *Tech Phys Lett.* 2020 V. 46. № 3. P. 224–227.
13. *Mochalov K.E., Chistyakov A.A., Solovyeva D.O. et al.* An instrumental approach to combining confocal microspectroscopy and 3D scanning probe nanotomography. // *Ultramicroscopy.* 2017. V. 182. P. 118–123.

## INVESTIGATION OF THE DISTRIBUTION OF MAGNETIC NANOPARTICLES IN TUMOR TISSUES BY THE METHOD OF SCANNING MAGNETIC FORCE NANOTOMOGRAPHY

O. I. Agapova<sup>a</sup>, A. E. Efimov<sup>a</sup>, K. E. Mochalov<sup>b</sup>, D. O. Solovyeva<sup>b</sup>,  
E. V. Svirshchetskaya<sup>b</sup>, S. M. Klimentov<sup>c</sup>, A. A. Popov<sup>c</sup>, V. A. Oleinikov<sup>b,c</sup>,  
I. I. Agapov<sup>a,#</sup>, and Academician of the RAS S. V. Gautier<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup> *Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>c</sup> *National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russian Federation*

<sup>d</sup> *Sechenov University, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: igor\_agapov@mail.ru*

The development of effective biomedical technologies using magnetic nanoparticles (MNPs) for the tasks of oncotherapy and nanodiagnosics requires the development and implementation of new methods for the analysis of micro- and nanoscale distributions of MNPs in the volume of cells and tissues. The paper presents a new approach to three-dimensional analysis of MNP distributions – scanning magnetic force nanotomography as applied to the study of tumor tissues. Correlative reconstruction of MNP distributions and nanostructure features of the studied tissues made it possible to quantitatively estimate the parameters of three-dimensional distributions of composite nanoparticles based on silicon and iron oxide obtained by femtosecond laser ablation and injected intravenously and intratumorally into tumor tissue samples of B16/F1 mouse melanoma. The developed technology based on the principles of scanning probe nanotomography is applicable for studying the features of three-dimensional micro- and nanoscale distributions of magnetic nanoparticles in biomaterials, cells and tissues of various types.

**Keywords:** scanning probe nanotomography, magnetic nanoparticles, tumor tissues, hyperthermia, magnetic force microscopy

УДК 612.13, 577.35

## ЛОКАЛИЗАЦИЯ МЕХАНИЗМОВ АМПЛИТУДНО-ЧАСТОТНОЙ МОДУЛЯЦИИ ПУЛЬСОВОГО КРОВЕНАПОЛНЕНИЯ МИКРОСОСУДИСТОГО РУСЛА МЯГКИХ ТКАНЕЙ. ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

© 2022 г. А. А. Гриневич<sup>1,\*</sup>, Б. Г. Гарамян<sup>1</sup>, Н. К. Чемерис<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН В.И. Шабалиным

Поступило 15.01.2022 г.

После доработки 04.02.2022 г.

Принято к публикации 04.02.2022 г.

Анализ периферического кровообращения используется для неинвазивной оценки состояния сердечно-сосудистой системы. Целью было изучение возможности применения спектрального анализа Гильберта–Хуанга (ГХ) для локализации механизмов нелинейной регуляции динамики кровенаполнения мягких тканей дистальных участков рук человека. У 9 здоровых испытуемых проводилась синхронная регистрация фотоплетизмограм (ФПГ) с указательных пальцев рук. С помощью полосового фильтра выделялся кардиосигнал, который разделялся на несущую и модулирующую компоненты. Последняя подвергалась декомпозиции на эмпирические моды методом ГХ. Выявлено 5 мод, для которых оценивался показатель когерентности между руками. Частоты полученных мод попадали в известные частотные интервалы низкочастотных колебаний кожного кровотока, а показатель их когерентности составил величину, близкую к 0.6. Результаты свидетельствуют о преимущественно центральном происхождении нелинейной регуляции динамики кровенаполнения мягких тканей на руках.

**Ключевые слова:** сердечно-сосудистая система, микроциркуляция, пульсовая волна, демодуляция, преобразование Гильберта, анализ Гильберта–Хуанга, фазовая когерентность

**DOI:** 10.31857/S2686738922030040

Изучение регуляторных механизмов периферического кровообращения, в частности, динамики кровенаполнения мягких тканей дистальных участков конечностей, является одним из неинвазивных подходов к оценке функционального состояния сердечно-сосудистой системы (ССС) в норме и при патологиях [1]. Для измерения пульсового кровенаполнения мягких тканей обычно используют метод фотоплетизмографии (ФПГ) [2, 3].

Пульсовая волна, распространяясь от левого желудочка сердца по аорте и далее по сосудам уменьшающегося калибра до микрососудов мягких тканей, претерпевает ряд воздействий со сто-

роны нервной и гуморальной регуляторных систем, которые в рамках концепции сетевой физиологии тесно взаимосвязаны между собой [4]. В результате этих воздействий формируется сложная колебательная динамика кровенаполнения мягких тканей, с характерными паттернами на ФПГ сигнале. Основным вклад в формирование мультикомпонентного частотного спектра колебаний вносят такие факторы, как вариабельность сердечного ритма, мгновенный ударный объем крови, активность вегетативной нервной системы, а также активность и локализация гуморальной и микроциркуляторной регуляции [1, 5, 6].

Для оценки вклада регуляторных процессов в мультикомпонентные поличастотные физиологические сигналы, характеризующие состояние ССС, обычно используют спектральный анализ. Он позволяет выявлять аддитивные вклады регуляторных процессов в формирование анализируемого сигнала [7, 8]. Однако интерес представляет не только линейное, но и нелинейное (мультипликативное) влияние регуляторных процессов

<sup>1</sup> Институт биофизики клетки Российской академии наук — обособленное подразделение ФГБУ науки “Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”, Пушкино, Россия

\*e-mail: grin\_aa@mail.ru

на исследуемый физиологический сигнал. Одним из способов выявления таких воздействий и соответствующих регуляторных механизмов является выделение модулирующей компоненты сигнала в заданном частотном диапазоне с последующим ее анализом. Мы предполагаем, что если колебательные компоненты амплитудной модуляции кровенаполнения мягких тканей подушечек пальцев на правой и левой руках синхронизированы по фазе, то они с большой степенью вероятности формируются нелинейными регуляторными процессами, локализованными до точки бифуркации дуги аорты на левую и правую подключичные артерии. В противном случае эти колебательные компоненты отражают нелинейную регуляцию кровотока, локализованную после точки бифуркации на артериях, артериолах и микрососудах мягких тканей каждой руки.

Одним из способов анализа сложно модулированных нелинейных сильно нестационарных сигналов является преобразование Гильберта–Хуанга [9, 10]. Этот метод представляет собой амплитудно-частотно-временной анализ временных рядов без априорного функционального базиса преобразования, в отличие от Фурье или вейвлет анализа. Последние могут быть корректно применены для анализа линейных, стационарных и эргодичных временных рядов.

Целью исследования является оценка возможности применения спектрального анализа Гильберта–Хуанга для локализации механизмов нелинейной регуляции динамики кровенаполнения мягких тканей дистальных участков верхних конечностей у человека.

В пилотном исследовании участвовало 9 условно здоровых испытуемых (5 женщин и 4 мужчины). Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 2002 г. Характеристики испытуемых: средний возраст –  $36 \pm 7$  лет, рост –  $171 \pm 6$  см, вес –  $73 \pm 15$  кг, артериальное давление (АД) –  $117 \pm 12 / 79 \pm 10$  мм рт.ст., ЧСС –  $67 \pm 8$  уд./мин. Критерии включения: нормальное телосложение, отсутствие острых и хронических сердечно-сосудистых заболеваний. Критерии исключения: наличие острых и хронических сердечно-сосудистых и легочных заболеваний, а также прием вазоконстрикторов и вазодилататоров.

Измерения проводились в условиях покоя. Испытуемые лежали на спине в тихой комнате, при нормальной комнатной температуре 20–24°C. Непрерывная синхронная регистрация двух ФПГ проводилась в течение 20 мин с подушечек указательных пальцев правой и левой руки с частотой сэмплирования 1 кГц с последующим пересэмплированием методом линейной интерполяции на 20 Гц (рис. 1а). Для регистрации использовался фотоплетизмограф “Angioscan” (Россия).

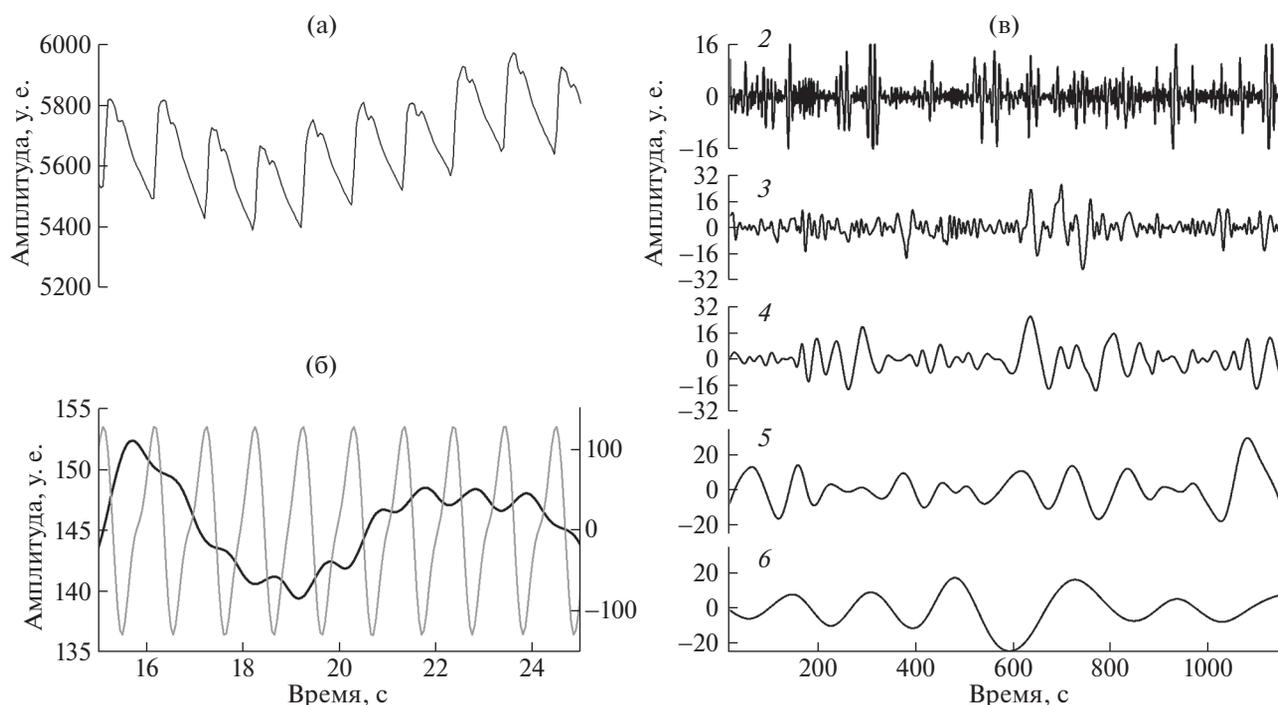
Для выделения кардиоритма проводили фильтрацию измеренных сигналов с использованием полосового фильтра (0.6–2 Гц), с последующим разделением на модулирующую и несущую компоненты (рис. 1б). Модулирующие компоненты сигналов подвергались декомпозиции на эмпирические моды методом Гильберта–Хуанга (рис. 1в) [9]. Средняя фазовая когерентность между эмпирическими модами левой и правой руки вычислялась с помощью кросс-спектрального анализа с использованием аналитических сигналов, формируемых при помощи преобразования Гильберта.

Анализ измеренных сигналов и статистическая обработка результатов проводились в среде Matlab R2016a (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез был 0.05.

Эмпирическая декомпозиция модулирующей компоненты кардиоритма в ФПГ-сигналах выявила 8 эмпирических мод для левой и правой руки каждого испытуемого. Первая мода (M1) соответствовала усредненному по времени значению периода кардиоритма, имела низкую амплитуду и была исключена из дальнейшего анализа как артефакт остаточного присутствия кардиоритма в модулирующем сигнале. Моды M7 и M8 имели средний по времени период колебаний более 500 с, который нельзя считать статистически достоверно определяемым ритмом из-за ограниченной длины записи (20 мин), и не были включены в дальнейший анализ.

Выявленные нами периоды и соответствующие им частоты мод Гильберта–Хуанга с M2 по M5 (табл. 1) попадают в известные частотные интервалы колебаний скорости кожного кровотока, которые, возможно, обусловлены следующими регуляторными механизмами: 0.145–0.6 Гц – респираторным, 0.056–0.145 Гц – миогенным, 0.021–0.056 Гц – нейрогенным и 0.005–0.021 Гц – эндотелиальным [8]. Это дает основание предполагать, что эти механизмы могут быть связаны с процессами низкочастотной модуляции колебания кровенаполнения мягких тканей подушечек пальцев рук.

Чтобы локализовать механизмы амплитудно-частотной модуляции кардиоритма, регулирующие динамику распространения пульсовой волны, мы предположили, что, если модуляция осуществляется процессами на участке сердечно-сосудистой системы общей для обеих рук (сердце, аорта), то на подушечках пальцев правой и левой руки она будет охарактеризована как преимущественно когерентный процесс. Если же процессы модуляции кардиоритма расщеплены по сосудам сердечно-сосудистой системы, то процесс модуляции может быть охарактеризован как частично когерентный. Мы сравнили показатель



**Рис. 1.** Фрагменты сигналов для одного из испытуемых: (а) – фрагмент оригинальной записи ФПГ с указательного пальца левой руки, (б) – модулирующий (сплошная жирная черная линия, ось слева) и несущий (сплошная тонкая серая линия, ось справа) компоненты сигнала кардиоритма, отфильтрованного в полосе частот 0.6–2 Гц из регистрируемого ФПГ-сигнала, (в) – декомпозиция методом Гильберта-Хуанга модулирующего компонента на эмпирические моды (представлены моды со 2 по 6, номера над кривыми).

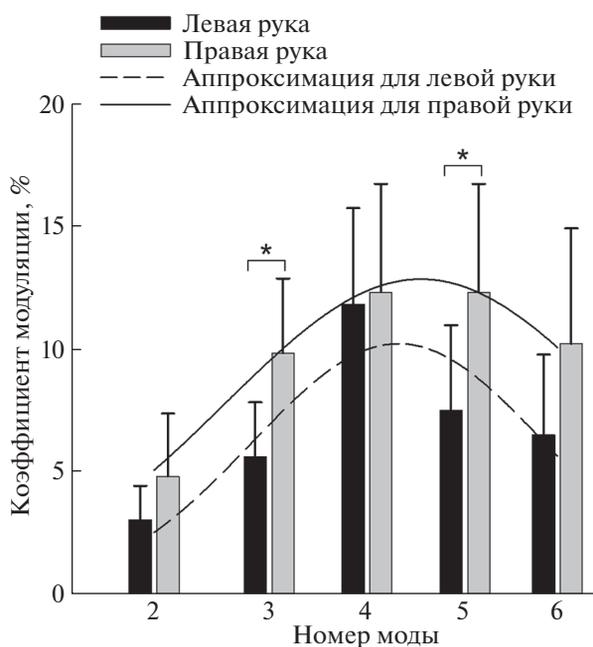
когерентности Гильберта между модами правой и левой руки и обнаружили, что его значение для мод с М2 по М6 лежит вблизи 0.6 (табл. 1). Это дает основание считать, что механизмы регуляции динамики распространения пульсовой волны рассредоточены по сердечно-сосудистой системе с преобладанием вклада общих для обеих рук процессов: вариабельности сердечного ритма и вариабельности величины мгновенного ударного объема выброса крови в аорту. Последний фактор может быть определяющим для формы пульсовой волны [11, 12].

Несущая составляющая кардиоритма в сигнале ФПГ представляет собой немодулированный сигнал кардиоритма, а амплитуда этого сигнала определяет амплитуду кардиоритма (АК). Статистический анализ показал, что усредненные по группе испытуемых АК для левой и правой руки составляли  $186.3 \pm 69.2$  и  $180.4 \pm 67.9$  у.е. соответственно (данные представлены как среднее  $\pm$  СКО) и достоверно не различались. Отношение усредненных по времени амплитуд мод модулирующей компоненты кардиоритма в сигнале ФПГ к АК определяет коэффициенты глубины модуляции

**Таблица 1.** Усредненные по времени периоды (Т) и частоты (Ч) мод, и средняя фазовая когерентность (Ког.) между модами левой (Л. р.) и правой (П. р.) руки

Мода		М2	М3	М4	М5	М6
Т, с	Л. р.	$4.78 \pm 1.27$	$15.06 \pm 3.34$	$39.92 \pm 7.19$	$106.05 \pm 30.2$	$266.4 \pm 90.4$
	П. р.	$4.57 \pm 1.14$	$14.78 \pm 2.86$	$38.8 \pm 5.75$	$104.9 \pm 25.1$	$249.1 \pm 49.7$
Ч, Гц	Л. р.	$0.22 \pm 0.05$	$0.70 \pm 0.17 (\times 10^{-1})$	$0.26 \pm 0.05 (\times 10^{-1})$	$0.10 \pm 0.03 (\times 10^{-1})$	$0.41 \pm 0.12 (\times 10^{-2})$
	П. р.	$0.23 \pm 0.05$	$0.70 \pm 0.13 (\times 10^{-1})$	$0.26 \pm 0.04 (\times 10^{-1})$	$0.10 \pm 0.02 (\times 10^{-1})$	$0.42 \pm 0.08 (\times 10^{-2})$
Ког.		$0.62 \pm 0.14$	$0.57 \pm 0.09$	$0.57 \pm 0.09$	$0.61 \pm 0.13$	$0.55 \pm 0.31$

Примечание. Данные представлены как среднее  $\pm$  СКО.



**Рис. 2.** Коэффициенты глубины модуляции эмпирических мод со 2 по 6 для левой и правой руки. Кривыми показана их аппроксимация функциями Гаусса. \* – достоверное различие между левой и правой рукой ( $t$ -критерий Стьюдента,  $p < 0.05$ ). Данные представлены как среднее  $\pm$  СКО.

(ГМ) для каждой моды. На рис. 2 представлены коэффициенты ГМ мод со 2 по 6 для левой и правой руки. Видно, что ГМ для левой руки ниже, чем для правой и достоверно различаются для 3 и 5 моды. Распределение ГМ по номерам мод хорошо аппроксимируется функциями Гаусса. Аппроксимация показывает, что ширина колокола для левой руки меньше, чем для правой.

Возможно, что наблюдаемые различия связаны с тем, что путь, проходимый ПВ по артериям от сердца до указательных пальцев левой и правой руки, различен. Для правой руки ПВ сначала проходит через дугу аорты, затем следует через брахиоцефальный ствол, правую подключичную артерию и далее через подмышечную артерию. В отличие от правой, для левой руки ПВ от дуги аорты сразу идет к левой подключичной артерии и далее через подмышечную артерию. Артерии на пути ПВ имеют разный диаметр и толщину стенки. Эти различия могут вносить вклад в глубину модуляции кардиокомпоненты в сигнале ФПГ, но они, как было показано в работах других авторов, не влияют на усредненное время прохождения ПВ [13, 14].

В работе представлена новая технология оценки пространственной и функциональной локализации механизмов нелинейной регуляции кровенаполнения мягких тканей дистальных участков конечностей у человека на основе частотно-временного анализа Гильберта–Хуанга. Мы впервые

показали, что существует нелинейная регуляция кардиосигнала как части ФПГ-сигнала, отражающего колебания кровенаполнения подушечек указательных пальцев рук. Регуляция обуславливает изменение динамических параметров ПВ, и, предположительно, обеспечивает эффективную подстройку сердечно-сосудистого гомеостаза к потребностям тканей конечностей в кислороде и в питательных веществах. Эффективность нелинейной регуляции может заключаться в получении значимых эффектов в периферическом русле при малых воздействиях регуляторных процессов на сердечную деятельность. Принципиальная возможность такого поведения с использованием низкоинтенсивных шумовых воздействий на сердце была показана при помощи математического моделирования в работе [15]. Выявленные нами 5 значимых эмпирических мод (сигналов), модулирующих кардиосигнал в ФПГ-сигнале, могут быть связаны как с центральными, так и с локальными, распределенными по артериальному руслу конечностей, регуляторными механизмами. Центральные могут быть обусловлены процессами, регулируемыми ВСР и динамику выброса крови из левого желудочка, а локальные – различными процессами, в том числе, определяющими регуляцию скорости кожного кровотока. При этом ведущую роль играют центральные регуляторные механизмы, о чем свидетельствует 60% фазовая синхронизация модулирующих сигналов между руками. Сниженные коэффициенты

глубины модуляции кардиосигнала для левой руки по сравнению с правой свидетельствуют либо о разных путях, проходимых ПВ в левой и правой руке, либо о том, что все испытуемые были правшами. Это также может быть причиной того, что форма распределения коэффициентов глубины модуляции по модам имеет более узкий колокол для левой руки, чем для правой.

Разработанный подход может быть применен для дифференциального измерения динамических параметров скорости распространения ПВ в анатомически отдельных участках сосудистого русла, что позволит идентифицировать локальный вклад частотно зависимых регуляторных процессов как разницу сигналов на входе и выходе для исследуемого участка артериального русла. Знание о механизмах регуляции динамики распространения ПВ позволит разработать новые инструментальные методы выявления и количественной оценки степени нарушений систем регуляции кровоснабжения мягких тканей конечностей на ранних стадиях развития патологических изменений при проведении скрининговых обследований. На основе отдельных элементов предложенной технологии могут быть разработаны новые специализированные методы и подходы количественной оценки динамики физиологических процессов, как составной части целостного организма в условиях изменяющихся параметров среды как внутри, так и вне организма.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят всех сотрудников ИБК РАН, участвовавших в выполнении представленного исследования в качестве добровольных испытуемых, и наша особая благодарность к.б.н. А.В. Танканаг и к.б.н. И.В. Тихоновой за техническую поддержку в проведении данного исследования.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Allen J.* Photoplethysmography and its application in clinical physiological measurement // *Physiol Meas.* 2007. V. 28. № 3. P. R1–39.
2. *Peter L., Noury N., Cerny M.* A review of methods for noninvasive and continuous blood pressure monitoring: Pulse transit time method is promising? // *IRBM.* 2014. V. 35. P. 271–282.
3. *Welykholowa K., Hosanee M., Chan G., et al.* Multimodal Photoplethysmography-Based Approaches for Improved Detection of Hypertension // *Journal of Clinical Medicine.* 2020. V. 9. № 4. P. 1203.
4. *Balague N., Hristovski R., Almarcha M., et al.* Network Physiology of Exercise: Vision and Perspectives // *Front Physiol.* 2020. V. 11. P. 611550.
5. *Allen J., Zheng D., Kyriacou P.A., et al.* Photoplethysmography (PPG): state-of-the-art methods and applications // *Physiol. Meas.* 2021. V. 42. P. 100301.
6. *Liu B., Zhang Z., Di X., et al.* The Assessment of Autonomic Nervous System Activity Based on Photoplethysmography in Healthy Young Men // *Front. Physiol.* 2021. V. 12. P. 733264.
7. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology // *Circulation.* 1996. V. 93. P. 1043–1065.
8. *Stefanovska A., Bracic M., Kvernmo H.D.* Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser Doppler technique // *IEEE Trans Biomed Eng.* 1999. V. 46. P. 1230–1239.
9. *Huang N.E., Zheng S., Steven R.L., et al.* The Empirical Mode Decomposition and the Hilbert Spectrum for Nonlinear and Non-Stationary Time Series Analysis // *Proceedings of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences.* 1998. V. 454. P. 903–95.
10. *Тычков А.Ю.* Применение модифицированного преобразования Гильберта-Хуанга для решения задач цифровой обработки медицинских сигналов // *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Технические науки.* 2018. Т. 3. № 47. С. 70–82.
11. *King D., Price A.* Measuring cardiac output using the PiCCO system // *British Journal of Cardiac Nursing.* 2008. V. 3. P. 11.
12. *Hewitt N.A., Braaf S.C.* The Clinical application of pulse contour cardiac output and intrathoracic volume measurements in critically ill patients // *Australian Critical Care.* 2006. V. 19. P. 86–94.
13. *Kortekaas M.C., Niehof S.P., van Velzen M.H., et al.* Comparison of bilateral pulse arrival time before and after induced vasodilation by axillary block // *Physiol Meas.* 2012. V. 33. P. 1993–2002.
14. *Kortekaas M.C., van Velzen M.H.N., Grüne F., et al.* Small intra-individual variability of the pre-ejection period justifies the use of pulse transit time as approximation of the vascular transit // *PLoS One.* 2018. V. 13. P. e0204105.
15. *Grinevich A.A., Tankanag A.V., Chemeris N.K.* Mathematical modeling of low-frequency oscillations induced by modulated noise in human microvasculature // *Proc. SPIE, Saratov Fall Meeting 2019: Computations and Data Analysis: from Nanoscale Tools to Brain Functions.* 2020. V. 11459. P. 114590S.

## LOCALIZATION OF MECHANISMS OF AMPLITUDE-FREQUENCY MODULATION OF PULSE BLOOD PERFUSION OF THE SOFT TISSUE MICROVASCULATURE. PILOT STUDY

A. A. Grinevich<sup>a,#</sup>, B. G. Gharamyan<sup>a</sup>, and N. K. Chemeris<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Cell Biophysics of Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation*

<sup>#</sup> *e-mail:grin\_aa@mail.ru*

Presented by Academician of the RAS V.I. Shabalin

Peripheral blood flow analysis is used for noninvasive assessment of the cardiovascular system. The aim was to investigate the possibility of applying Hilbert–Huang spectral analysis (HH) to localize the mechanisms of nonlinear regulation of blood perfusion dynamics in the soft tissues of distal areas of the hands in human. In 9 healthy subjects, synchronous recording of photoplethysmograms (PPG) from the index fingers of the hands was performed. Using a band-pass filter, a cardiac signal was extracted from the PPG, which was separated into the carrier and modulating components. The latter was subjected to decomposition into empirical modes by HH method. Five modes were detected, for which the coherence between the hands was evaluated. The frequencies of the modes fell within the conventional frequency intervals of skin blood flow oscillations, and the coherence was 0.6. A decreased depth of modulation in the left hand compared to the right hand was shown. The results indicate a central origin of the nonlinear regulation of the dynamics of tissue blood perfusion in the hands.

*Keywords:* cardiovascular system, microcirculation, pulse wave, demodulation, Hilbert transform, Hilbert–Huang analysis, phase coherence

УДК 581.1

## ПОЛИМЕТАЛЛИЧЕСКИЙ СТРЕСС ИЗМЕНЯЕТ ЭНДОГЕННЫЙ СТАТУС БРАССИНОСТЕРОИДОВ И СНИЖАЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ФОТОСИСТЕМЫ II У РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ

© 2022 г. Е. Д. Данилова<sup>1,\*</sup>, Р. П. Литвиновская<sup>2</sup>, И. Е. Злобин<sup>3</sup>, Л. В. Коломейчук<sup>1</sup>,  
О. К. Мурган<sup>1</sup>, А. Л. Савчук<sup>2</sup>, В. А. Хрипач<sup>2</sup>,  
член-корреспондент РАН В. В. Кузнецов<sup>1,3</sup>, М. В. Ефимова<sup>1</sup>

Поступило 20.02.2022 г.

После доработки 04.03.2022 г.

Принято к публикации 04.03.2022 г.

Исследовали влияние полиметаллического стресса ( $Mn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ , а также  $Al^{3+}$ ) различной продолжительности и интенсивности на эндогенное содержание brassinosterоидов (БС) и фотохимическую активность фотосистемы II у растений ячменя. Содержание стероидных гормонов определяли методом двухстадийного иммуноферментного анализа. Впервые установили, что растения ячменя реагировали на полиметаллический стресс изменением эндогенного содержания различных групп фитостероидов (24S-метилБС, 24-эпиБС, 28-гомоБС, В-лактонБС и 6-кетоБС). Показано, что стресс-зависимая динамика изменения эндогенного содержания различных групп БС характеризуется органоспецифичностью и определяется возрастным состоянием растений, интенсивностью действующего стрессора и спецификой brassinosterоидов. Наблюдаемые изменения эндогенного статуса БС в растениях ячменя при полиметаллическом стрессе сопровождаются ингибированием ростовых процессов, снижением содержания основных фотосинтетических пигментов и некоторым понижением эффективности фотохимических процессов в ФС II ( $F_v/F_m$ , ETR,  $qN$  и NPQ). Принимая во внимание полифункциональный стресс-защитный эффект brassinosterоидов, высказывается предположение, что изменение эндогенного статуса БС на фоне полиметаллического загрязнения носит адаптивный характер и позволяет минимизировать повреждающее воздействие токсичных тяжелых металлов и алюминия.

**Ключевые слова:** полиметаллический стресс, *Hordeum vulgare*, brassinosterоиды, рост, функционирование фотосинтетического аппарата

**DOI:** 10.31857/S2686738922030039

Глобальное загрязнение пахотных земель тяжелыми металлами представляет собой одну из самых актуальных проблем устойчивого развития мирового сельского хозяйства [1, 2]. Избыточные концентрации тяжелых металлов в среде негативно влияют на рост и развитие растений, нарушая физиологические и биохимические функции, что приводит к снижению продуктивности и пищевой ценности растительного сырья [3]. Некоторые тяжелые металлы, такие как ртуть, свинец,

кадмий и хром, являются высокотоксичными элементами и могут представлять серьезную опасность для всей экосистемы.

Значительное число исследований демонстрирует реакции растений, в том числе злаковых, на избыточные концентрации тяжелых металлов. Однако, как правило, данные работы ограничиваются изучением влияния одного или нескольких ионов, когда как в естественной среде растения сталкиваются с повышением содержания в почве одновременно целого ряда тяжелых металлов [1, 4]. Это делает актуальным изучение ответа растения непосредственно на полиметаллический стресс.

Важную роль в процессе адаптации растений к неблагоприятным условиям среды играют фитогормоны, такие как абсцизовая кислота, гиббереллины, ауксины, цитокинины, этилен и brassinosterоиды (БС) [5, 6]. Вызываемые стрессом

<sup>1</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>3</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: nusy.l.d@gmail.com

**Таблица 1.** Концентрации используемых тяжелых металлов и алюминия

Наименование металла	Концентрация, мкМ	
	“Низкая”	“Высокая”
Al <sup>3+</sup>	10	20
Mn <sup>2+</sup>	25	50
Cd <sup>2+</sup>	1.4	2.8
Cu <sup>2+</sup>	1	2
Ni <sup>2+</sup>	8	16
Zn <sup>2+</sup>	20	40
Pb <sup>2+</sup>	15	30

изменения эндогенного баланса фитогормонов и их сигналинга способствуют адаптации растений к изменяющимся условиям обитания. Так, например, трансгенные растения арабидопсис со сниженным эндогенным уровнем БС характеризуются гиперчувствительностью к действию абиотических стрессоров [7]. Напротив, увеличенное содержание эндогенных БС приводит к повышению устойчивости растений кукурузы к засухе [8]. Кроме того, установлено, что в ответ на повышенную концентрацию ионов никеля [9] и кадмия [10] в растениях горчицы и риса наблюдается увеличение эндогенного содержания групп brassinosteroidов, таких как 6-кетоны БС и 24-эпиБС. В свою очередь, экзогенные БС способствуют снижению негативного эффекта тяжелых металлов на растения [11]. Однако до сих пор остается открытым вопрос о том, каким образом изменяется эндогенное содержание БС при адаптации растений к полиметаллическому стрессу разной интенсивности и продолжительности действия.

Цель нашей работы заключалась в исследовании ответных физиологических реакций растений ячменя и, прежде всего, изменения эндогенного содержания brassinosteroidов, на совместное действие полиметаллического стресса (Mn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, а также Al<sup>3+</sup>) различной интенсивности и продолжительности.

Исследования проводили на растениях ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Биом. Растения выращивали в грунте с добавлением перлита в течение пяти суток при температуре 20 ± 2°C, плотности потока квантов ФАР 200–250 мкмоль м<sup>2</sup> с<sup>-1</sup> и относительной влажности 40–60% в фитотроне с 16-часовым фотопериодом. Далее в течение пяти суток растения адаптировали к условиям жидкой питательной среды по Blamey (рН 4.5) [12] с низким содержанием фосфора. Данная питательная среда наиболее полно соответствует реальному почвенному составу подверженных закислению

загрязненных территорий, где доступность металлов для растений повышена из-за низких значений рН [4]. После этого часть растений перенесли на ту же питательную среду по Blamey (контроль) или на среду с тяжелыми металлами и алюминием в разных концентрациях (“низкой” и “высокой”) (табл. 1). Действующие концентрации используемых тяжелых металлов (Mn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> и Pb<sup>2+</sup>) и алюминия (Al<sup>3+</sup>) подобраны на основании типичных значений концентраций данных ионов в почвенном растворе промышленно загрязненных кислых почв [13, 14] и по результатам ранее проведенных нами экспериментов [4].

Через пять (15-суточные растения) и десять (20-суточные растения) суток воздействия полиметаллического стресса оценивали ростовые параметры (длину осевых органов, суммарную площадь листовой поверхности (расчет осуществляли по формуле Аникеева и Кутузова [15]), сырую и сухую биомассы), содержание хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и каротиноидов [16] и фотохимическую активность фотосинтетического аппарата растений на РАМ-флуориметре (Mini-РАМ II, “Heinz-Walz”, Germany). Образцы ячменя (побеги и корни) фиксировали в жидком азоте и лиофильно высушивали. Лиофилизацию растительных образцов проводили под вакуумом с помощью сублимационной камеры VirTis 6211 (“LabX”, США). Содержание стероидных гормонов группы brassinoliда (24S-метил-БС), группы 24-эпибрассинолида (24-эпи-БС), группы 28-гомобрассинолида (28-гомо-БС), В-лактонов (В-лактонБС) и В-кетонных (6-кетоБС) проводили методом двухстадийного иммуноферментного анализа, как описано ранее [17, 18].

Эксперимент проводили в трех биологических повторностях; использовали не менее 70 растений на каждый вариант опыта. Полученные результаты представлены в таблицах и на рисунках в виде средней арифметической со стандартной ошибкой. Для сравнения независимых выборок, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали параметрический критерий Стьюдента. Значения *t*-критерия находили для 95% уровня значимости (*p* < 0.05).

При воздействии полиметаллического стресса отмечено снижение ростовых параметров — длины осевых органов, массы растений и суммарной площади ассимилирующей поверхности. Наибольшую чувствительность проявляли корни. Снижение длины корня в условиях полиметаллического стресса составляло 40% относительно контроля, тогда как снижение длины стебля на двадцатые сутки эксперимента не превышало 15% относительно контроля вне зависимости от действующей концентрации металлов (табл. 2). Наиболее выраженный негативный эффект по-

**Таблица 2.** Влияние полиметаллического стресса (ПМ) на ростовые параметры растений ячменя

Возраст, сут	Варианты	Длина стебля, см	Длина корня, см	Суммарная площадь листьев, см <sup>2</sup>	Сырая масса всего растения, г
15	Контроль	8.90 ± 0.28	16.53 ± 0.35	11.11 ± 0.21	0.63 ± 0.02
	Низкая концентрация ПМ (5 сут)	8.78 ± 0.22	9.56 ± 0.23*	8.97 ± 0.20*	0.59 ± 0.01
	Высокая концентрация ПМ (5 сут)	8.38 ± 0.16*	10.00 ± 0.20*	8.13 ± 0.25*	0.52 ± 0.02*
20	Контроль	11.13 ± 0.27	20.69 ± 0.30	17.43 ± 0.29	0.89 ± 0.02
	Низкая концентрация ПМ (10 сут)	9.09 ± 0.20*	12.47 ± 0.23*	12.69 ± 0.22*	0.64 ± 0.02*
	Высокая концентрация ПМ (10 сут)	9.56 ± 0.18*	11.89 ± 0.28*	12.80 ± 0.18*	0.64 ± 0.02*

Примечание. \* $p < 0.05$  при сравнении с контрольным значением.

лиметаллического загрязнения на рост корня объясним тем фактом, что именно корневая система первой подвергается воздействию веществ, находящихся в почве или жидкой среде.

Через пять суток действия тяжелых металлов наблюдалась концентрационная зависимость ингибирования площади листовой поверхности и массы растений в зависимости от интенсивности полиметаллического стресса.

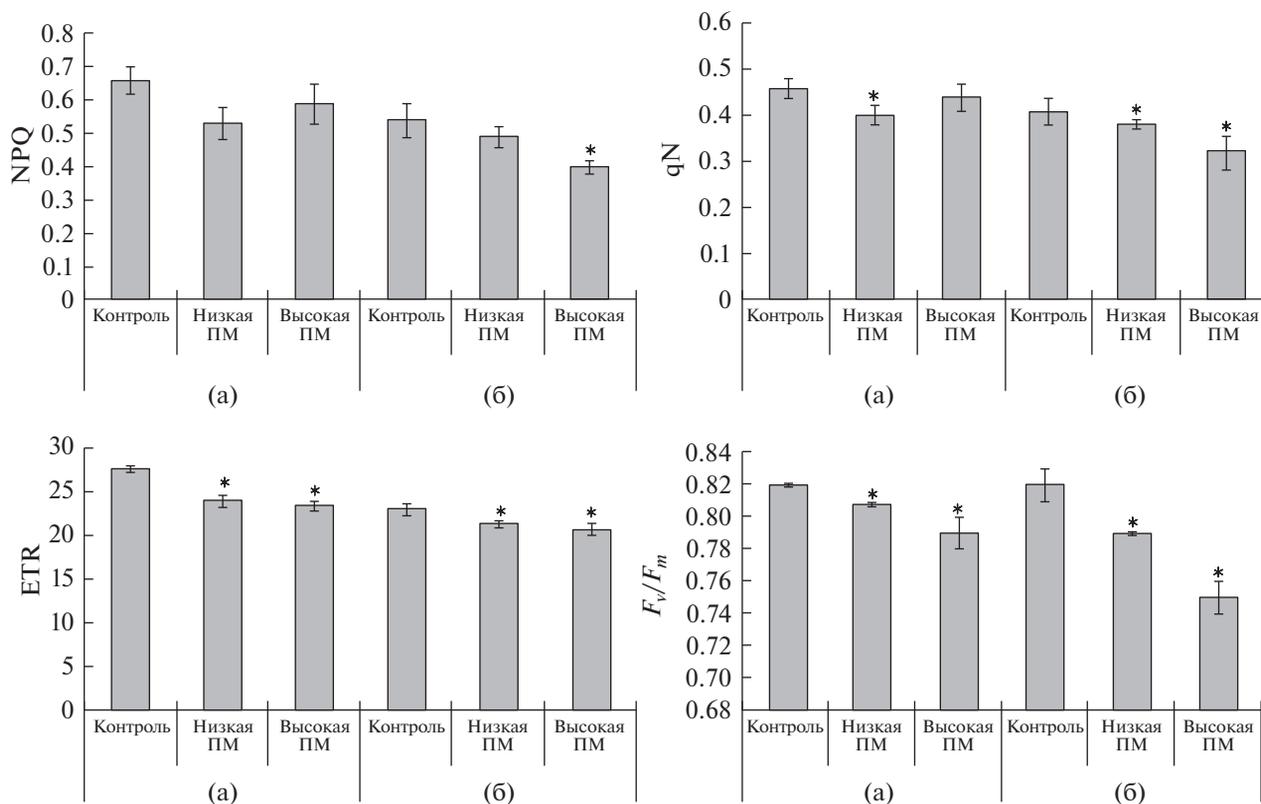
Помимо ростовых процессов, ключевой мишенью повреждающего действия тяжелых металлов у растений является фотосистема II (ФС II). Одним из основных критериев эффективности протекания фотохимических процессов в ФС II является максимальная квантовая эффективность ( $F_v/F_m$ ). Полученные данные свидетельствуют о том, что  $F_v/F_m$  листьев растений снижалась на 3–8% относительно контроля (рис. 1), в зависимости от концентрации металлов и продолжительности их воздействия. Кроме того, в условиях стресса наблюдались достоверное уменьшение скорости транспорта электронов (ETR) и некоторое снижение коэффициентов нефотохимической нерегулируемой ( $q_N$ ) и регулируемой (NPQ) диссипации энергии на 3–7 и 4–26% соответственно, относительно контроля (рис. 1).

Из полученных данных следует, что избыточное содержание тяжелых металлов и алюминия в питательном растворе в течение пяти суток вызвало снижение уровня хлорофиллов и каротиноидов (на 24–39%) по сравнению с их содержанием в растениях контрольного варианта (рис. 2). Отмечено, что количество пигментов в контрольной группе растений возрастало в ходе эксперимента. Различия между содержанием хлорофиллов и каротиноидов в контрольных условиях и при стрессе на двадцатые сутки эксперимента составляли 40–70% (рис. 2). Наиболее подвержен воздействию металлов был хлорофилл *b*.

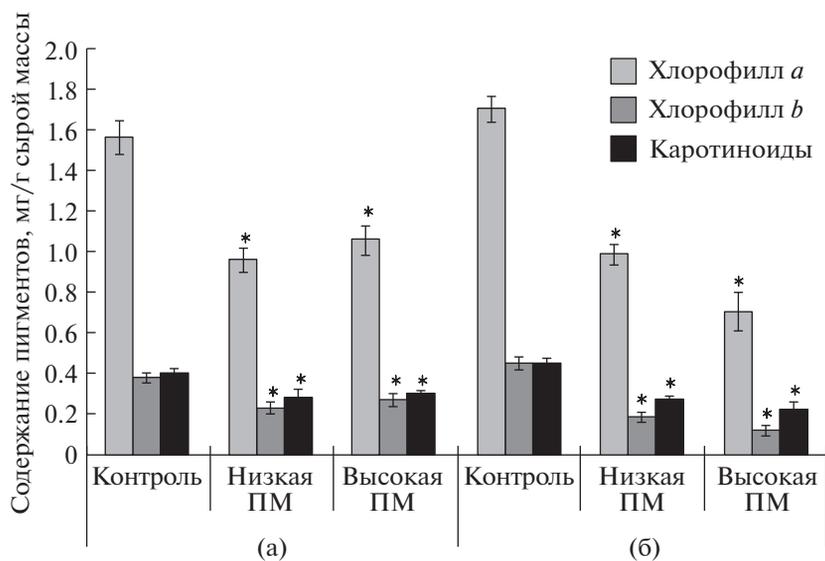
В табл. 3 и 4 представлены результаты экспериментов по влиянию полиметаллического стресса разной интенсивности и продолжительности на

эндогенное содержание разных групп БС (группы брассинолида – 24S-метилБС; 24-эпибрассинолида – 24-эпиБС; 28-гомобрассинолида – 28-гомоБС; В-лактонов – В-лактонБС и 6-кетон – 6-кетоБС) в побегах (листьях и стеблях) и корнях растений ячменя. Полученные данные свидетельствуют, прежде всего, о том, что уровень всех анализируемых групп стероидных фитогормонов, за исключением 28-гомоБС, в побегах растений превышал их содержание в корнях (табл. 3). Кроме того, эндогенное содержание БС различных групп в побегах не зависело от возрастного состояния растений, тогда как в корнях уровень БС в значительной степени определялся возрастом. Самое высокое содержание фитогормонов отмечено у растений в возрасте пятнадцати суток, тогда как на двадцатые сутки (с момента помещения их в перлит) уровень брассиностероидов в пересчете на единицу массы снижался, за исключением групп 28-гомоБС и 6-кетон (табл. 3, 4).

Интересно, что содержание 24-эпиБС и 28-гомоБС в побегах растений ячменя снижалось в ответ на действие низкой и высокой интенсивностей ПМ загрязнения, при этом достоверная реакция отмечена при высокой концентрации стрессора (табл. 3). В то время как корни растений отвечали снижением уровня гормонов групп 24S-метилБС и 24-эпиБС, а также увеличением 28-гомоБС через пять суток воздействия ПМ вне зависимости от их концентрации. Увеличение всех групп анализируемых гормонов стероидной природы отмечено в корнях растений ячменя при ПМ воздействии низкой интенсивности в течение 10 сут. При этом двухкратное увеличение концентрации ПМ практически не изменяло содержание анализируемых групп БС (табл. 3, 4). Увеличение содержания эндогенных брассиностероидов при действии тяжелых металлов, вероятно, связан с процессами адаптации растений к стрессу. Однако ответная реакция растений на воздействие тяжелыми металлами не всегда однозначна и видоспецифична. Так, экзогенное влияние кадмия, свинца или меди не приводило к из-



**Рис. 1.** Влияние полиметаллического стресса (ПМ) на состояние фотосинтетического аппарата листьев ячменя. а – возраст 15 сут, действие полиметаллов 5 сут; б – возраст 20 сут, действие полиметаллов 10 сут. \* $p < 0.05$  при сравнении с контрольным значением.



**Рис. 2.** Влияние полиметаллического стресса (ПМ) на содержание фотосинтетических пигментов в листьях ячменя. а – возраст 15 сут, действие полиметаллов 5 сут; б – возраст 20 сут, действие полиметаллов 10 сут. \* $p < 0.05$  при сравнении с контрольным значением.

менениям эндогенного содержания brassinолита у растений хлореллы [19].

Таким образом, полученные экспериментальные данные впервые позволили продемонстри-

ровать, что растения ячменя отвечали на ПМ стресс разнонаправленным изменением эндогенного содержания анализируемых групп brassиностероидов (24S-метилБС, 24-эпиБС, 28-гомоБС,

**Таблица 3.** Влияние полиметаллического стресса (ПМ) на количественное содержание brassinosterоидов (нг/г лиоф. веса) в растениях ячменя

Возраст, сут	Варианты	24S-метилБС		24-эпиБС		28-гомоБС	
		Побег	Корень	Побег	Корень	Побег	Корень
15	Контроль (5 сут)	4.65 ± 0.92	0.48 ± 0.03	8.41 ± 0.76	7.36 ± 0.60	1.06 ± 0.09	0.92 ± 0.10
	Низкая концентрация ПМ (5 сут)	2.72 ± 0.40*	0.29 ± 0.02*	7.44 ± 1.12	3.65 ± 0.78*	0.75 ± 0.07*	1.63 ± 0.13*
	Высокая концентрация ПМ (5 сут)	3.98 ± 0.69	0.25 ± 0.02*	5.79 ± 0.58*	4.71 ± 0.13*	0.44 ± 0.06*	1.42 ± 0.13*
20	Контроль (10 сут)	5.05 ± 0.63	<0.1	8.77 ± 0.79	3.39 ± 0.18	0.99 ± 0.17	0.92 ± 0.10
	Низкая концентрация ПМ (10 сут)	7.10 ± 1.09	0.15 ± 0.01	5.24 ± 0.53*	4.66 ± 0.16*	0.71 ± 0.04	1.61 ± 0.19*
	Высокая концентрация ПМ (10 сут)	6.93 ± 1.33	0.14 ± 0.01	2.13 ± 0.25*	3.74 ± 0.37	0.47 ± 0.02*	1.31 ± 0.20*

Примечание.\* $p < 0.05$  при сравнении с контрольным значением.

**Таблица 4.** Влияние полиметаллического стресса (ПМ) на количественное содержание brassinosterоидных В-лактонов и б-кетонов (нг/г лиоф. веса) в растениях ячменя

Возраст, сут	Варианты	В-лактоны БС		б-кетоны БС	
		Побег	Корень	Побег	Корень
15	Контроль (5 сут)	5.20 ± 0.80	3.07 ± 0.29	7.10 ± 0.61	2.43 ± 0.48
	Низкая концентрация ПМ (5 сут)	6.80 ± 1.02	1.91 ± 0.19	7.97 ± 0.56	2.38 ± 0.41
	Высокая концентрация ПМ (5 сут)	8.07 ± 1.39*	3.03 ± 0.19	7.86 ± 0.72	2.86 ± 0.24
20	Контроль (10 сут)	4.97 ± 0.71	1.86 ± 0.19	10.80 ± 1.75	1.91 ± 0.21
	Низкая концентрация ПМ (10 сут)	4.58 ± 0.80	4.28 ± 0.20*	11.38 ± 1.54	3.20 ± 0.31
	Высокая концентрация ПМ (10 сут)	4.68 ± 0.46	3.89 ± 0.30*	13.50 ± 2.40	2.35 ± 0.53

Примечание.\* $p < 0.05$  при сравнении с контрольным значением.

В-лактонБС и б-кетоБС). Несмотря на столь сложную реакцию растений на совместное действие тяжелых металлов, стресс-зависимая динамика изменения эндогенного содержания различных групп БС определяется возрастным состоянием растений, интенсивностью действующего стрессора и спецификой brassinosterоидов. Подобные изменения эндогенного статуса БС в растениях ячменя при ПМ стрессе сопровождаются органоспецифическим ингибированием ростовых процессов, снижением содержания основных фотосинтетических пигментов и некоторым падением эффективности фотохимических процессов в ФС II ( $F_v/F_m$ , ETR, qN и NPQ). Принимая во внимание полифункциональный стресс-защитный эффект brassinosterоидов, нельзя исключать, что наблюдаемая нами динамика изменения эндогенного статуса фитостероидов в растениях ячменя на фоне полиметаллического загрязнения носит адаптивный характер и позволяет минимизировать повреждающее воздействие целого ряда токсичных тяжелых металлов и алюминия.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 20-54-00013, 20-34-90094 и проекта БРФФИ № X20P-235.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Srivastava V., Sarkar A., Singh S., et al.* // *Frontiers in Environmental Science*. 2017. V. 5. P. 64.
2. *Hou D., O'Connor D., Igalavithana A.D. et al.* // *Nature Reviews Earth & Environment*. 2020. V. 1. P. 366–381.
3. *Kisa D.* // *Journal of Natural and Applied Sciences*. 2018. V. 22. P. 1–6.
4. *Danilova E.D., Zlobin I.E., Kuznetsov V.V., et al.* // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2021. V. 499. P. 348–353.
5. *Kolomeichuk L.V., Danilova E.D., Khripach V.A., et al.* // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2021. V. 68. № 3. P. 297–307.
6. *Hossain A., Venugopalan V.K., Rahman M. A., et al.* // *Emerging Plant Growth Regulators in Agriculture*. 2022. P. 99–130.

7. Zeng H., Tang Q., Hua X. // Journal Plant Growth Regulation. 2010. V. 29. № 1. P. 44–52.
8. Tumova L., Tarkowska D., Rehorova K., et al. // PLoS One. 2018. V. 13. № 5. e0197870.
9. Kanwar M.K., Bhardwaj R., Chowdhary S.P. et al. // Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology. 2012. V. 6. № 2. P. 84–89.
10. Yu L., Ding J., Wang Y., et al. // Analytical Chemistry. 2016. V. 88. P. 1286–1293.
11. Боднарь И.С., Чебан Е.В. // Принципы экологии. 2020. № 1. С. 27–42.
12. Blamey F.P.C., Hernandez-Soriano M.C., Cheng M., et al. // Plant Physiology. 2015. V. 169. № 3. P. 2006–2020.
13. Kopittke P.M., Blamey F.P.C., Asher C. J., et al. // Journal of Experimental Botany. 2010. V. 61. P. 945–954.
14. Li Z., Wang P., Menzies N. W., et al. // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2018. V. 147. P. 872–880.
15. Аникеев В.В., Кутузов Ф.Ф. // Физиология растений. 1961. Т. 8. С. 375–377.
16. Lichtenthaler H.K. // Methods Enzymology. 1987. V. 148. P. 350–382.
17. Ефимова М.В., Литвиновская Р.П., Медведева Ю.В. и др. // Доклады Академии наук. 2019. Т. 485 (№ 1). С. 117–121.
18. Pradko A.G., Litvinovskaya R.P., Sauchuk A. L., et al. // Steroids. 2015. V. 97. P. 78–86.
19. Bajguz A. // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2011. V. 60. P. 406–416.

## POLYMETALLIC STRESS CHANGES THE ENDOGENOUS STATUS OF BRASSINOSTEROIDS AND REDUCES THE EFFECTIVENESS OF PHOTOCHEMICAL REACTIONS PHOTOSYSTEM II IN BARLEY PLANTS

**E. D. Danilova<sup>a, #</sup>, R. P. Litvinovskaya<sup>b</sup>, I. E. Zlobin<sup>c</sup>, L. V. Kolomeichuk<sup>a</sup>,  
O. K. Murgan<sup>a</sup>, A. L. Sauchuk<sup>b</sup>, V. A. Khripach<sup>b</sup>,  
Corresponding Member of the RAS V. V. Kuznetsov<sup>a, c</sup>, and M. V. Efimova<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> National research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

<sup>c</sup> Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>#</sup> e-mail: nusy.l.d@gmail.com

The effect of polymetallic stress ( $Mn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ , and  $Al^{3+}$ ) of different duration and intensity on the endogenous brassinosteroids (BS) content and photochemical activity of photosystem II in barley plants was studied. The steroid hormones content was determined by a two-stage enzyme immunoassay. It was established for the first time that barley plants responded to polymetallic stress by changing the endogenous content of various phytosteroid groups (24S-methylBS, 24-epiBS, 28-homoBS, B-lactoneBS, and 6-ketoBS). It was shown that the stress-dependent dynamics of changes in the endogenous content of various BS groups is characterized by organ specificity and is determined by the age state of plants, the intensity of the acting stressor, and the specificity of brassinosteroids. The observed changes in the endogenous status of BS in barley plants under polymetallic stress are accompanied by inhibition of growth processes, a decrease in the content of the main photosynthetic pigments, and a slight decrease in the efficiency of photochemical processes in PS II ( $F_v/F_m$ , ETR, qN, and NPQ). Considering the multifunctional stress-protective effect of brassinosteroids, it is suggested that the change in the endogenous status of BS against the background of polymetallic pollution is adaptive and allows minimizing the damaging effects of toxic heavy metals and aluminum.

**Keywords:** polymetallic stress, *Hordeum vulgare*, brassinosteroids, growth, functioning of the photosynthetic apparatus

УДК 569:551.763.1(517)

## ПРЯМОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО СМЕНЫ МОЛЯРИФОРМНЫХ ЗУБОВ У *GOBICONODON BORISSIAKI* (GOBICONODONTIDAE, MAMMALIA) ИЗ РАННЕГО МЕЛА МОНГОЛИИ

© 2022 г. Академик РАН А. В. Лопатин<sup>1,\*</sup>

Поступило 21.01.2022 г.

После доработки 15.02.2022 г.

Принято к публикации 15.02.2022 г.

Из раннемелового местонахождения Зун-Ховур в Монголии (аймак Уверхангай, сомон Гучин-Ус) описан фрагмент верхнечелюстной кости эутриконодонта *Gobiconodon borissiaki* Trofimov, 1978 (Gobiconodontidae), демонстрирующий второй моляриформный зуб третьей генерации  $M^2RR$  в стадии прорезывания при наличии почти нестертого  $M^4R$  и альвеол  $M^3R$  и  $M^5$ . Это первое прямое свидетельство смены моляриформных зубов у *Gobiconodon* из раннего мела Монголии. Томографическое изучение образца показало отсутствие минерализованных закладок других зубов.

**Ключевые слова:** *Gobiconodon borissiaki*, Gobiconodontidae, эутриконодонты, мезозойские млекопитающие, смена моляриформных зубов, ранний мел, Монголия

DOI: 10.31857/S2686738922030052

Гобиконодонтиды – плотоядные млекопитающие из группы эутриконодонтов, широко распространенные в раннемеловую эпоху в Евразии и Северной Америке [1–3]. Для Gobiconodontidae установлено наличие смены коренных (моляриформных) зубов, несвойственной для класса Mammalia [1, 4–6].

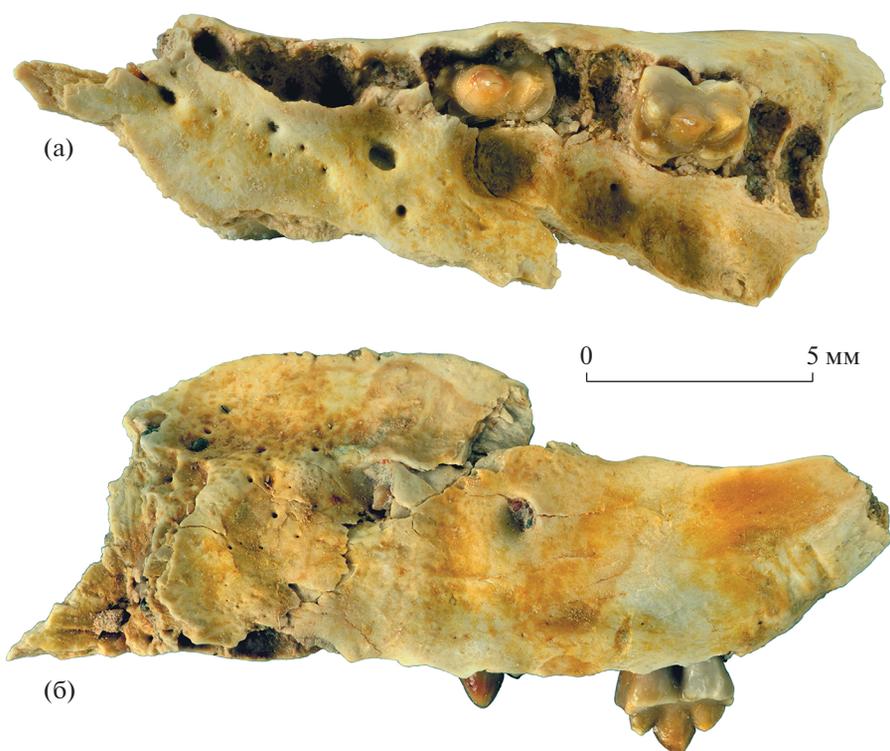
Прямые наблюдения полупрорезавшихся (erupting) или целиком находящихся внутри альвеолярных полостей непрорезавшихся (cryptic) нижних моляриформных зубов *Gobiconodon ostromi* Jenkins et Schaff, 1988 из раннего мела Северной Америки показали, что этот вид имел больше одной генерации моляриформных зубов [4]. Аналогичные свидетельства были получены для верхних и нижних зубных рядов *Spinolestes xenarthrosus* Martin et al., 2015 из раннего мела Испании [6]. У *Gobiconodon borissiaki* Trofimov, 1978 и *G. hoburensis* (Trofimov, 1978) из раннего мела Монголии – первых описанных представителей группы [7] – факт смены моляриформных зубов не был непосредственно зафиксирован (в том числе при рентгенографическом изучении), но презюмировался по различиям в степени стирания зубов соседних локусов [1, 4, 5].

Проведенное нами ранее [1] изучение возрастной изменчивости зубной системы гобиконодонтид из местонахождения Ховур (Höövör, Khovoor) позволило установить, что *Gobiconodon hoburensis* имел две генерации нижних моляриформных зубов (пять зубов в первой генерации и четыре во второй, т.е.  $M_1$ – $M_5$  и  $M_1R$ – $M_4R$ ), а более крупный *G. borissiaki* – три генерации (по пять зубов в первой и второй генерациях, два зуба в третьей генерации, т.е.  $M_1$ – $M_5$ ,  $M_1R$ – $M_5R$  и  $M_1RR$ – $M_2RR$ ). У еще более крупного (реконструированная [4] масса тела около 2 кг) *G. ostromi* в третьей генерации было три нижних моляриформных зуба ( $M_1RR$ – $M_3RR$ ). Зубы разных генераций на определенных этапах онтогенеза функционировали одновременно, на наиболее поздней стадии моляриформный ряд зубов у *G. hoburensis* включал  $M_1R$ – $M_4R$  и  $M_5$ , у *G. borissiaki* –  $M_1RR$ – $M_2RR$  и  $M_3R$ – $M_5R$ , у *G. ostromi* –  $M_1RR$ – $M_3RR$  и  $M_4R$ – $M_5R$ .

В настоящей статье описан фрагмент верхнечелюстной кости *G. borissiaki*, демонстрирующий наличие второго моляриформного зуба в стадии прорезывания. Это первое прямое свидетельство смены моляриформных зубов у *Gobiconodon* из раннего мела Монголии. Образец (экз. ПИН, № 5593/30) происходит из местонахождения Зун-Ховур (Zuun-Höövör, Zun-Khovoor) в Гучинской впадине Северной Гоби (сомон Гучин-Ус, аймак Уверхангай, 45°21'41" с.ш., 102°34'35" в.д.; хухтыкская свита, апт-альб) [8, 9]; он был найден в 2019 г. в

<sup>1</sup> Палеонтологический институт им. А.А. Борисяка  
Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: alop@paleo.ru



**Рис. 1.** *Gobiconodon borissiaki* Trofimov, 1978, экз. ПИН, № 5593/30, фрагмент левой верхнечелюстной кости с  $M^2RR$  в стадии прорезывания, функциональным  $M^4R$  и альвеолами  $C^1$ ,  $P^1$ ,  $P^2$ ,  $M^1RR$ ,  $M^3R$  и  $M^5$ : а – с окклюзионной стороны, б – с лабиальной стороны; местонахождение Зун-Ховур, Монголия; хухтыкская свита, нижний мел.

ходе работ Совместной российско-монгольской палеонтологической экспедиции (СРМПЭ), хранится в коллекции Палеонтологического института им. А.А. Борисяка РАН (ПИН), Москва.

Фрагмент верхнечелюстной кости (экз. ПИН, № 5593/30) имеет низкий в основании скуловой отросток; передний край корня скулового отростка находится над передней частью локуса  $M^4$ , задний край – за локусом  $M^5$ . Крупное переднее подглазничное отверстие расположено над локусом  $M^1$ , более мелкое заднее подглазничное отверстие – над задней альвеолой локуса  $M^2$ . На поверхности небного отростка верхнечелюстной кости вблизи передней части зубного ряда (до уровня локуса  $M^1$  включительно) имеются несколько крупных и мелких отверстий. Лингвальное ряда моляриформных зубов располагаются четыре глубокие и обширные небные впадины; особенно крупные впадины локализованы на уровне промежутков между зубами локусов  $M^2$ – $M^3$ ,  $M^3$ – $M^4$  и  $M^4$ – $M^5$ .

На экз. ПИН, № 5593/30 сохранились альвеолы трех передних зубов: однокорневых  $C^1$  и  $P^1$  и крупного двухкорневого  $P^2$  [см. 10]. В моляриформном ряду представлены альвеолы локусов  $M^1$ ,  $M^3$  и  $M^5$ , коронка зуба в состоянии прорезы-

вания в локусе  $M^2$  и почти нестертый функциональный зуб в локусе  $M^4$  (рис. 1).

Последний верхний моляриформный зуб  $M^5$  у *G. borissiaki* в нестертом состоянии функционировал одновременно с нестертым  $M^2R$  и сильно стертыми  $M^3$ – $M^4$  [5, рис. 1А, 1В]. Присутствие нестертых, слабо или умеренно стертых крупных моляриформных зубов в третьем и четвертом локусах при наличии  $M^5$  (или его полностью сформированных альвеол) указывает на их принадлежность ко второй генерации –  $M^3R$ – $M^4R$ ; по размерам зубы этой генерации существенно превосходили своих предшественников [1, табл. 3: экз. ПИН, № 3101/20]. Аналогично, последний нижний моляриформный зуб  $M_5$  у *G. borissiaki* прорезывался при сильно стертых  $M_2R$  и  $M_3$ – $M_4$  и затем функционировал одновременно с  $M_1RR$ – $M_2RR$  и  $M_3R$ – $M_4R$  [1].

Исходя из этих данных, онтогенетические признаки зубов, сохранившихся на экз. ПИН, № 5593/30, позволяют определить их принадлежность к конкретным зубным генерациям. Почти нестертый крупный моляриформный зуб в предпоследнем локусе при наличии альвеол  $M^5$  должен идентифицироваться как  $M^4R$  (четвертый верхний моляриформный зуб второй генерации). Соответственно, полупрорезавшийся моляри-

формный зуб – это  $M^2RR$  (второй верхний моляриформный зуб третьей генерации), а пустые альвеолы остальных моляриформных зубов принадлежат  $M^1RR$  и  $M^3R$ .

Судя по длине альвеол,  $M^1RR$  – самый короткий зуб в ряду моляриформных зубов, тогда как  $M^2RR$  – самый длинный.  $M^2RR$  крупнее известных  $M^2R$  [1, табл. 3] и имеет лучше выраженный эктофлексус. Три главных бугорка расположены в один продольный ряд, центральный бугорок А намного массивнее и выше переднего бугорка В и заднего бугорка С, а бугорок В существенно ниже бугорка С. Цингулюм широкий, хорошо выраженные мелкие цингулярные бугорки располагаются в его антеролабиальной части, а также на лабиальной и лингвальной сторонах на уровне пережима между бугорками А и С.

$M^4R$  поперечно расширенный, с хорошо развитыми цингулярными бугорками Е и D, выступающими соответственно антеролабиально и постеролабиально. Лабиальная сторона в середине резко вогнута, эктофлексус глубокий. Лингвальная сторона значительно, но плавно вогнута на уровне вершины центрального бугорка. Передний и задний бугорки заметно смещены лабиально по отношению к центральному бугорку. Центральный бугорок А примерно в полтора раза шире и выше бугорков В и С, последние два приблизительно одинаковой высоты и ширины, но при этом бугорок В несколько уступает бугорку С по длине. Цингулюм широкий, хорошо выражены лингвальные цингулярные бугорки. Зуб почти нестертый, очень слабое апикальное стирание затронуло вершины главных бугорков и три самых крупных лингвальных цингулярных бугорка, передний из которых расположен в антеролингвальной части цингулюма, второй выступает сразу за ним на уровне задней части бугорка В, а третий находится на уровне передней части бугорка С.

Альвеолы  $M^5$  располагаются в основании корня скуловой дуги, сильно вытянуты поперечно.

Размеры экз. ПИН, № 5593/30 (L – длина, W – ширина, в мм):  $M^2RR$ : L – 2.75; W – 1.6;  $M^4R$ : L – 2.55; W – 2.1; альвеолярная длина  $M^1RR$ – $M^5$  – 10.7.

Томографическое изучение образца, проведенное на рентгеновском микротомографе NeoScan N80 в ПИН, показало отсутствие минерализованных зубных закладок внутри альвеол  $M^3R$ ,  $M^4R$ ,  $M^5$  и других зубов (рис. 2). Корни полупрорезавшегося  $M^2RR$  не полностью сформированные, короткие (вдвое короче, чем у  $M^4R$ ), с крупными пульпарными каналами, широко открытыми терминально. Концы корней  $M^4R$  без следов резорбции, корневые каналы узкие. В альвеолах  $M^3R$  и  $M^4R$  костная ткань между корнями

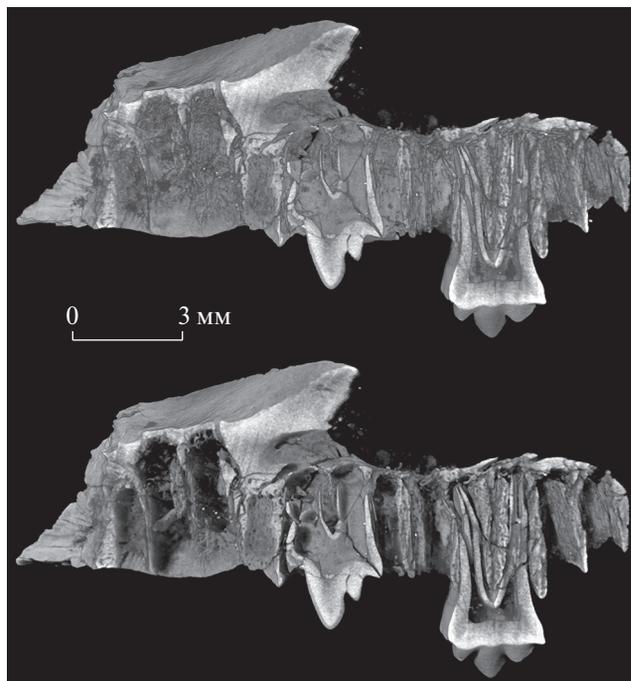


Рис. 2. *Gobiconodon borissiakii* Trofimov, 1978, экз. ПИН, № 5593/30, фрагмент левой верхнечелюстной кости с лабиальной стороны, томограмма с различными эффектами освещения; местонахождение Зун-Ховур, Монголия; хухтыкская свита, нижний мел.

плотная, без полостей и крупных пустот, что указывает на отсутствие зачатков замещающих зубов.

Наличие  $M^2RR$  и отсутствие замещающих зубов в локусах  $M^3R$ – $M^4R$  соответствуют установленному для *G. borissiakii* числу нижних зубов второй и третьей генераций ( $M_1R$ – $M_5R$  и  $M_1RR$ – $M_2RR$ ) [1]. Отсутствие зубной закладки в локусе  $M^5$  может быть связано с более поздним прорезыванием  $M^5R$ , аналогично нижнему зубному ряду, где  $M_5R$  функционировал одновременно со стертыми  $M_1RR$ – $M_2RR$  и  $M_3R$ – $M_4R$  [1, 10].

Характерные для *Spinolestes* особенности смены верхних моляриформных зубов (медиальное замещение зубов, более раннее прорезывание замещающего зуба в локусе  $M^2$  по сравнению с соседними зубами той же генерации) [6] у изученного экземпляра *Gobiconodon borissiakii* не отмечены.

Дифиодонтная зубная система с двумя генерациями резцов, клыков и премоляров и единственной генерацией моляриформных зубов – один из важнейших реперных признаков класса Mammalia. Поэтому открытие смены моляриформных зубов у *Gobiconodon* поначалу произвело ошеломляющее впечатление на исследователей [4]. Однако возврат к множественной, полифиодонтной (точнее, олигофиодонтной, финализированной на

взрослой стадии, см. [11, 12]), смене моляриформных зубов не является чем-то совершенно экстраординарным в свете современного понимания эпигенетических механизмов. У амниот с полифиодонтной зубной сменой эпителиальная зубная пластинка присутствует на протяжении всей жизни и содержит стволовые клетки, необходимые для формирования зубов новых генераций [13]. У млекопитающих после формирования второй (постоянной) генерации зубов зубная пластинка деградирует в результате действия сложного механизма, включающего комбинацию миграции и трансформации клеток и апоптоза [13]. Этот механизм контролируется небольшим числом генов, сбой в работе которых способен привести к возобновлению множественной смены моляриформных зубов (пример см. [14]). Отверстия на лингвальной стороне межкорневых перегородок в альвеолах моляриформных зубов раннемеловых гобиконодонтид были ранее интерпретированы нами как ямки для эпидермальных тяжей, соединяющих зубные пластинки с растущими эмалевыми колпачками зачатков замещающих зубов [15].

Нами предполагается [1], что возврат к несвойственной для млекопитающих многократной смене коренных зубов был важной эволюционной адаптацией гобиконодонтид, позволявшей им долго расти, достигая относительно крупных размеров, охотиться на соответствующую по величине добычу и защищаться от других хищников.

Помимо гобиконодонтид, смена моляриформных зубов (по меньшей мере, две генерации) обнаружена у раннеюрского рода *Sinoconodon*, рассматриваемого как сестринский таксон по отношению к прочим млекопитающим [16]. Кроме того, на основании дифференцированного стирания (значительных различий в степени стирания соседних зубов) смена моляриформных зубов предполагается для морганукодонтов *Megazostrodon* [17] и *Morganucodon* [12] и раннемелового представителя амфидонтид *Acinacodus* [18].

Основные возражения против возможности смены моляриформных зубов у мезозойских млекопитающих (за исключением *Gobiconodontidae* и *Sinoconodon*) связаны с отсутствием находок образцов с сохранившимися зубами в состоянии смены. Однако такие экземпляры и должны встречаться очень редко, так как смена зубов происходила достаточно быстро, а зубные закладки могли сохраниться лишь на стадии их полной минерализации (как у *Gobiconodon ostromi* [4], *Spinolestes xenarthrosus* [6] и описанного выше экземпляра *G. borissiakii*). Тем не менее зубная смена в локусе M<sup>1</sup> зафиксирована у симметродонта *Kiyatherium* из раннего мела Западной Сибири [19]; возможно, смена первого

моляриформного зуба была общей чертой всех базальных трехнотериев [см. 1].

Таким образом, смена моляриформных зубов может быть более распространенным явлением среди мезозойских млекопитающих, чем обычно считается.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарен сотрудникам СРМПЭ К.К. Тарасенко, К.Ю. Еськову, А.А. Лозовскому, С.А. Харитонову (ПИН), Б. Баярмаа, С. Баасанхуу (Институт палеонтологии Монгольской академии наук, Улан-Батор, Монголия) за участие в сборах материалов в местонахождении Зун-Ховур в 2019 г., а также С.В. Багирову и Р.А. Ракитову (ПИН) за помощь в подготовке иллюстраций.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом в области науки в форме субсидий из федерального бюджета на обеспечение проведения научных исследований российскими научными организациями и (или) образовательными организациями высшего образования совместно с организациями стран СНГ и Монголии, в рамках обеспечения реализации программы двух- и многостороннего научно-технологического взаимодействия (госконтракт № 13.2251.21.0029, проект “Высшие позвоночные позднего мезозоя и кайнозоя Монголии”).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lopatin A.V., Averianov A.O. *Gobiconodon* (Mammalia) from the Early Cretaceous of Mongolia and revision of *Gobiconodontidae* // Journal of Mammalian Evolution. 2015. V. 22. № 1. P. 17–43.
2. Kusuhashi N., Wang Y.-Q., Li C.-K., Jin X. Two new species of *Gobiconodon* (Mammalia, Eutriconodonta, *Gobiconodontidae*) from the Lower Cretaceous Shahaï and Fuxin formations, northeastern China // Historical Biology. 2016. V. 28. № 1–2. P. 14–26.
3. Kusuhashi N., Wang Y.-Q., Li C.-K., Jin X. New gobi-conodontid (Eutriconodonta, Mammalia) from the Lower Cretaceous Shahaï and Fuxin formations, Liaoning, China // Vertebrata Palasiatica. 2020. V. 58. № 1. P. 45–66.
4. Jenkins F.A., Schaff C.R. The Early Cretaceous mammal *Gobiconodon* (Mammalia, Triconodonta) from the Cloverly Formation in Montana // Journal of Vertebrate Paleontology. 1988. V. 8. № 1. P. 1–24.
5. Kielan-Jaworowska Z., Dashzeveg D. Early Cretaceous amphilestid (‘triconodont’) mammals from Mongolia // Acta Palaeontologica Polonica. 1998. V. 43. № 3. P. 413–438.
6. Martin T., Marugán-Lobón J., Vulliamy R. et al. A Cretaceous eutriconodont and integument evolution in early mammals // Nature. 2015. V. 526. № 7573. P. 380–384.

7. Трофимов Б.А. Первые триконодонты (Mammalia, Triconodonta) из Монголии // Доклады Академии наук СССР. 1978. Т. 243. № 1. С. 213–216.
8. Лопатин А.В., Бадамгарав Д. Новое местонахождение раннемеловых млекопитающих Зун-Ховур (Уверхангай, Монголия) // Доклады Академии наук. 2013. Т. 453. № 4. С. 413–415.
9. Лопатин А.В. Следы зубов млекопитающих на кости эутриконодонта *Gobiconodon borissiaki* (Mammalia, Gobiconodontidae) из нижнего мела Монголии // Доклады Российской академии наук. Науки о Земле. 2022. Т. 502. № 1. С. 22–25.
10. Лопатин А.В. Раннемеловые млекопитающие из местонахождений Хамрын-Ус и Шалан-Ихэр в Монголии // Доклады Академии наук. 2017. Т. 477. № 1. С. 113–117.
11. Smith H.V. Evolutionary lines in tooth attachment and replacement in reptiles: their possible significance in mammalian dentition // Transactions of the Kansas Academy of Science. 1958. V. 61. № 2. P. 216–225.
12. Luo Z.-X., Kielan-Jaworowska Z., Cifelli R.L. Evolution of dental replacement in mammals // Bulletin of Carnegie Museum of Natural History. 2004. № 36. P. 159–175.
13. Whitlock J.A., Richman J.M. Biology of tooth replacement in amniotes // International Journal of Oral Science. 2013. V. 5. № 2. P. 66–70.
14. Малыгин В.М., Лыков Е.Ю., Каландадзе Н.Н. Сходство аномалий в зубной системе лисицы (*Vulpes vulpes*) с зубами териодонта двинии (*Dvinia prima*) // Териофауна России и сопредельных территорий. Международное совещание (IX съезд Териологического общества при РАН). М.: Товарищество научных изданий КМК, 2011. С. 296.
15. Averianov A.O., Skutschas P.P., Lopatin A.V. et al. Early Cretaceous mammals from Bol'shoi Kemchug 3 locality in West Siberia, Russia // Russian Journal of Theriology. 2005. V. 4. № 1. P. 1–12.
16. Crompton A.W., Luo Z.-X. Relationships of the Liassic mammals *Sinoconodon*, *Morganucodon oehleri*, and *Dinnetherium* // Szalay F.S., Novacek M.J., McKenna M.C., eds. Mammal phylogeny: Mesozoic differentiation, multituberculates, monotremes, early therians, and marsupials. New York: Springer, 1993. P. 30–44.
17. Gow C.E. A new skull of *Megazostrodon* (Mammalia, Triconodonta) from the Elliot Formation (Lower Jurassic) of southern Africa // Palaeontologia Africana. 1986. V. 26. № 2. P. 13–23.
18. Лопатин А.В., Мащенко Е.Н., Аверьянов А.О. Новый род триконодонтных млекопитающих из раннего мела Западной Сибири // Доклады Академии наук. 2010. Т. 433. № 6. С. 846–849.
19. Лопатин А.В., Аверьянов А.О., Мащенко Е.Н., Лецинский С.В. Раннемеловые млекопитающие Западной Сибири. 3. Zhangheotheriidae // Палеонтологический журнал. 2010. № 5. С. 90–98.

## DIRECT EVIDENCE OF THE MOLARIFORM TOOTH REPLACEMENT IN *GOBICONODON BORISSIAKI* (GOBICONODONTIDAE, MAMMALIA) FROM THE EARLY CRETACEOUS OF MONGOLIA

Academician of the RAS A. V. Lopatin<sup>a, #</sup>

<sup>a</sup> Borissiak Paleontological Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

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

The maxillary fragment of eutricodontan *Gobiconodon borissiaki* Trofimov, 1978 (Gobiconodontidae) is described from the Early Cretaceous Zuun-Höövör locality in Mongolia (Övörkhangaï aimag, Guchin-Uс sum). It demonstrates erupting M<sup>2</sup>RR (second molariform tooth of the third generation) along with the presence of the almost unworn M<sup>4</sup>R and alveoli of M<sup>3</sup>R and M<sup>5</sup>. This is the first direct evidence of the molariform tooth replacement in *Gobiconodon* from the Early Cretaceous of Mongolia. The CT study of the specimen revealed the absence of mineralized germs of other teeth.

**Keywords:** *Gobiconodon borissiaki*, Gobiconodontidae, eutricodontans, Mesozoic mammals, molariform tooth replacement, Early Cretaceous, Mongolia

УДК 631.4

## СОСТОЯНИЕ ПОЧВЕННЫХ ГЕЛЕЙ ПРИ РАЗНОЙ ПРОБОПОДГОТОВКЕ К ВИСКОЗИМЕТРИИ ОБРАЗЦОВ ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ ПОЧВЫ

© 2022 г. Член-корреспондент РАН С. А. Шоба<sup>1</sup>, Д. И. Потапов<sup>1</sup>, И. В. Горепекин<sup>1</sup>,  
Д. А. Ушкова<sup>1</sup>, Т. А. Грачева<sup>1,\*</sup>, Г. Н. Федотов<sup>1</sup>

Поступило 20.11.2021 г.

После доработки 02.02.2022 г.

Принято к публикации 02.02.2022 г.

С середины 20-го века хорошо известно наличие в почвах пленок органоминеральных гелей, покрывающих и связывающих между собой почвенные частицы. Было показано, что контакт почвы с водой приводит к поглощению воды гелями и их набуханию. Изменение свойств гелей в почвах должно проявляться в изменении вязкости почвенных паст. В работе предложено использовать для определения вязкости почвенных паст вибрационный вискозиметр. Для интерпретации полученных данных использован физический смысл, заложенный в формуле Эйнштейна. Благодаря этому появилась возможность оценивать степень набухания гелей по количеству воды, способной двигаться независимо от почвенных частиц, т.е. не включенной в состав почвенных гелей (свободной воды). Было изучено влияние на степень набухания почвенных гелей: 1) влажности почвенных образцов, из которых готовили почвенные пасты; 2) времени, прошедшего после добавления воды при приготовлении почвенных образцов, из которых в дальнейшем готовили почвенные пасты; 3) пробоподготовки почвенных образцов (исходных, автоклавированных, высушенных до воздушно-сухого и абсолютно-сухого состояний и вновь увлажненных), из которых затем готовили почвенные пасты. В ходе экспериментов установлено, что 1) с увеличением влажности почвенных образцов степень набухания почвенных гелей увеличивается; 2) при возрастании времени взаимодействия почвенных образцов с водой увеличивается степень набухания почвенных гелей; 3) в пастах, приготовленных из почвенных образцов, имеющих одинаковую влажность, но разную пробоподготовку, отличается степень набухания почвенных гелей.

**Ключевые слова:** высушивание почв, автоклавирование почв, вискозиметрия почвенных паст, свободная вода в почвах, гелевые структуры почв

**DOI:** 10.31857/S2686738922030076

В настоящее время для объяснения происходящих в почвах процессов широко используют физическую модель структурной организации почв [1]. Из нее следует, что почва состоит из твердой, жидкой и газообразной фаз.

Позднее появилась коллоидно-химическая модель [2], которая придает большое значение наличию на границе твердой и жидкой фаз органоминерального гелевого слоя, обеспечивающего существование не только ионообменных, но и других свойств почв. В частности, было показано, что при взаимодействии с почвами вода со временем теряет подвижность, входя в почвенные гели [3].

При этом экспериментальные методы, позволяющие оценить количество воды, входящей в почвенные гели, отсутствуют. В результате пред-

ставление о почвенных гелях и их набухании носит умозрительный характер, что мешает рассмотрению почв с позиции наличия и функционирования в них гелей.

В теории решения изобретательских задач (ТРИЗ) существует классический подход: “Если вы не можете измерить изменения в системе, то присоедините к системе внешнюю среду, отклик которой коррелирует с этими изменениями” [4]. В качестве внешней среды в данном случае удобно использовать воду, проводя изучение вязкости почвенных паст.

Для этой цели в почвоведении часто используют ротационную вискозиметрию [5]. Как правило, ее применяют для изучения изменений в пастах, возникающих под влиянием механического воздействия, т.е. ротационный вискозиметр измеряет состояние почвенных гелей. При этом для изучения состояния гелей в почвах необходим метод, позволяющий оценивать состояние гелей в почвенных пастах без их значимого изменения в процессе измерения.

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*e-mail: tanyadunaeva12@mail.ru

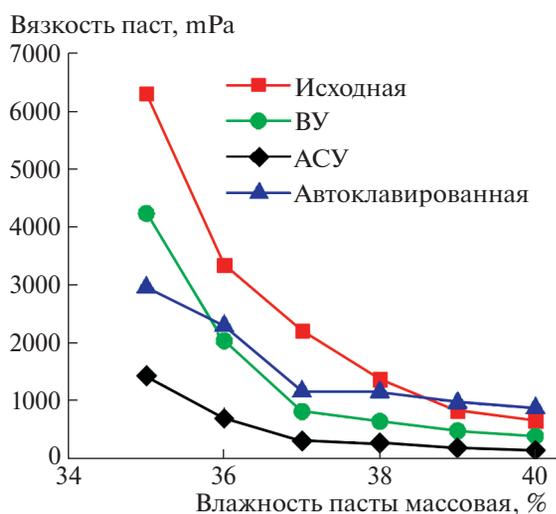


Рис. 1. Зависимость вязкости паст от содержания в них воды, приготовленных из почвенных образцов с разной пробоподготовкой, имеющих влажность 19%.

Таким методом является вибрационная вискозиметрия. Метод позволяет определять вязкость паст за короткое время, оказывая минимальное механическое воздействие на пасту и мало изменяя почвенные гели.

В связи с тем, что вода в пастах либо входит в состав почвенных гелей, либо является свободной<sup>1</sup> для получения информации о количестве свободной воды в пастах, которое должно характеризовать состояние гелей в почвах, удобно использовать уравнение Эйнштейна<sup>2</sup> [6].

Целью работы была оценка состояния почвенных гелей при их взаимодействии с водой для образцов с разной пробоподготовкой (предыстории).

Из цели вытекают следующие задачи по изучению влияния различных параметров пробоподготовки на состояние почвенных гелей:

- 1) влажности почвенных образцов, из которых готовили почвенные пасты;
- 2) времени, прошедшего после добавления воды при приготовлении почвенных образцов, из которых в дальнейшем готовили почвенные пасты;
- 3) пробоподготовки почвенных образцов (исходных, автоклавированных, высушенных до воздушно-сухого и абсолютно-сухого состояний и вновь увлажненных), из которых затем готовили почвенные пасты.

<sup>1</sup> Свободная вода — вода, способная двигаться независимо от почвенных частиц, т.е. не включенная в состав почвенных гелей.

<sup>2</sup> В количественной форме оно применимо только для неконцентрированных суспензий, но физический смысл его должен сохраняться и для концентрированных суспензий.

В работе использовали образцы исходной агродерново-глубокоподзолистой легкосуглинистой почвы<sup>3</sup> (Albic Retisols (Loamic, Agric, Cutanic, Ochric)), отобранные из пахотного горизонта в окрестностях поймы р. Яхромы, и образцы этой почвы, которые были предварительно высушены до воздушно-сухого и абсолютно-сухого состояний (ВС и АС), опять увлажнены и выдержаны в герметично закрытой емкости при температуре 26–28°C не менее 2 нед (ВУ и АСУ). Образцы почвы, прошедших термообработку, готовили, прогревая в автоклаве исходную почву при избыточном давлении 4.5 атм (148°C). Полученные образцы с разной пробоподготовкой увлажняли до требуемой влажности и выдерживали необходимое время. Пасты готовили, добавляя воду к почвам и перемешивая пасты в течение нескольких минут вручную.

Для определения вязкости паст использовали вибрационный вискозиметр SV-10 фирмы AND (Япония). Принцип работы прибора основан на поддержании амплитуды вынужденных колебаний чувствительного элемента (камертона), помещенного в вязкую среду, за счет изменения силы тока. Время измерения — 15 с. Амплитуда колебаний камертона 2 мм.

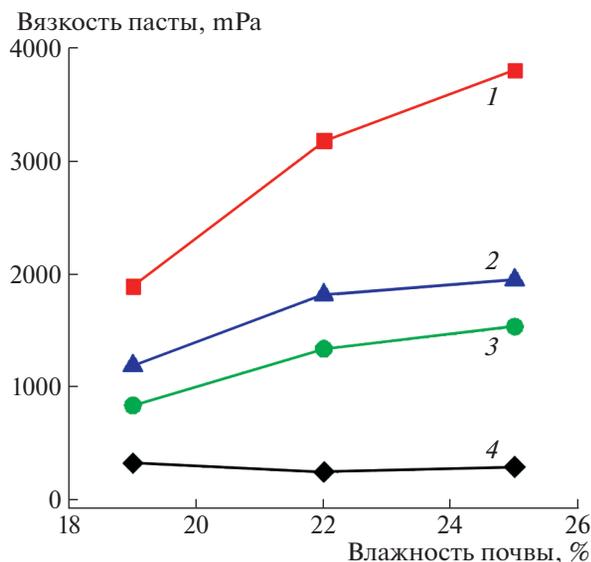
Было изучено влияние пробоподготовки образцов почв на вязкость полученных из них паст. Из полученных данных (рис. 1) хорошо видно, что:

- среди паст, приготовленных из образцов Исходной, Высушенной увлажненной и Абсолютно сухой почв, во всем интервале содержания в них воды они располагаются по вязкости последовательно — вязкость почв из Исходной почвы всегда выше, а из Абсолютно сухой почвы всегда ниже;
- кривая изменения вязкости пасты, приготовленной из Автоклавированной почвы, имеет более сложный характер и пересекает кривые для образцов паст из Исходной и Высушенной увлажненной почв.

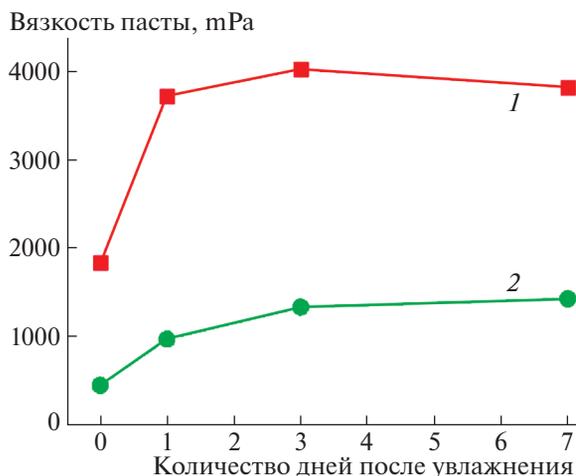
При изучении влияния влажности образцов почв до приготовления паст на вязкость паст хорошо видно (рис. 2), что увеличение влажности во всех случаях (за исключением Абсолютно сухой почвы) приводит к росту их вязкостей. Для паст, приготовленных из Абсолютно сухой почвы разных влажностей, вязкость значительно не изменяется.

Исследование влияния времени, прошедшего после доведения почвенных образцов до необходимой влажности, показало, что вязкость приго-

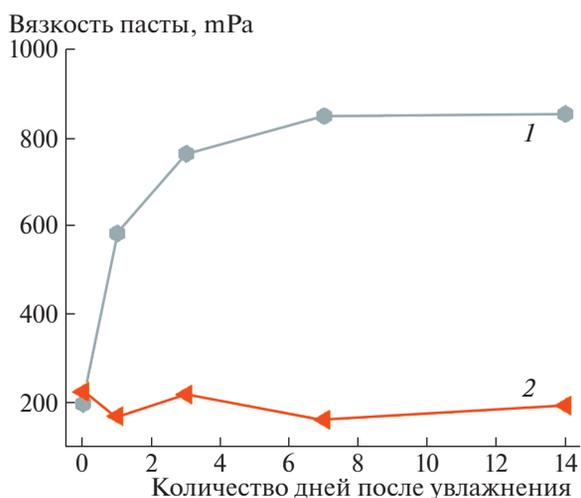
<sup>3</sup> Гранулометрический состав почв (по Н.А. Качинскому). Фракции: >1 мм = 1.33%; 1–0.25 = 2.87%; 0.25–0.05 = 25.82%; 0.05–0.01 = 42.78%; 0.01–0.005 = 6.73%; 0.005–0.001 = 8.22%; <0.001 = 12.25%. Общее содержание углерода, определенное на CNS анализаторе, составляет 1.65% (гумуса 2.8%).



**Рис. 2.** Зависимость вязкости пасты от исходной влажности образцов дерново-подзолистой почвы, имеющих разную пробоподготовку. Содержание воды в пастах пасты 37%. Почвы: 1 – исходная, 2 – автоклавированная, 3 – ВУ, 4 – АСУ.



**Рис. 3.** Динамика изменения вязкости пасты в зависимости от времени, прошедшего после увлажнения образцов Исходной (1) и ВУ (2) дерново-подзолистой почвы. Влажность почв до увлажнения 19%. Влажность почв после увлажнения 25%. Содержание воды в пастах 37%.



**Рис. 4.** Динамика изменения вязкости пасты в зависимости от времени, прошедшего после увлажнения ВУ (1) и АСУ (2) образцов дерново-подзолистой почвы. Влажность почвы 19%. Содержание воды в пастах 37%.

товленных из них паст от времени их взаимодействия с водой возрастает, выходя на постоянные значения через 3–7 сут (рис. 3–4). Причем почвенные образцы, уже содержащие относительно большие количества воды (Исходная и Высушенная увлажненная), приходят к равновесию быстрее (3 сут) по сравнению с Воздушно-сухой почвой (7 сут).

Для трактовки полученных результатов имеет смысл привлечь уравнение Эйнштейна для вязкости суспензий [6]:

$$\eta = \eta_0 (1 + 2.5\phi), \text{ где}$$

$\eta$  – вязкость суспензии;

$\eta_0$  – вязкость растворителя;

$\phi$  – объемная доля твердой фазы;

2.5 – коэффициент для сферических твердых частиц.

В количественной форме оно применимо только для неконцентрированных суспензий, но физический смысл его сохраняется и для концентрированных суспензий.

Из физического смысла этой формулы следует, что при одном и том же количестве воды повышение вязкости суспензии происходит за счет увеличения в ней объемной доли твердой фазы.

Массовая доля твердой фазы для паст с одинаковым содержанием воды, но приготовленных из почвенных образцов с разной пробоподготовкой (рис. 1), не отличается, но различия в вязкости суспензий свидетельствуют, что объемные доли твердой фазы в них разные.

Данное противоречие легко объясняется с позиций коллоидно-химической модели почв. Происходят два дополняющих друг друга процесса:

1) набухание гелей, за счет включения воды в их состав, приводящее к увеличению объемной доли твердой фазы почвы и, как следствие, повышению вязкости паст;

2) уменьшение количества свободной воды за счет ее поглощения почвенными гелями, также приводящее к повышению вязкости паст.

Таким образом, при одном и том же содержании воды в почвенной пасте ее вязкость будет зависеть от степени набухания гелей и соответственно количества поглощенной ими свободной воды. При этом объем твердой фазы почвы в пастах остается тем же, что и до их приготовления, поэтому показатель вязкости будет зависеть от степени расширения гелей, которую почва имела до измерения.

При трактовке полученных данных с этих позиций следует, что, во-первых, в почвенных образцах с разной пробоподготовкой при одинаковой влажности почвенные гели имеют разную степень набухания (рис. 1). Сильнее всего набухают почвенные гели Исходного образца, а меньше всего набухают почвенные гели образцов почвы, прошедшие термообработку при 105°C. Во-вторых, при увеличении влажности почвенных образцов степень набухания почвенных гелей возрастает (рис. 2). В-третьих, при возрастании времени взаимодействия почвенных образцов с водой увеличивается степень набухания почвенных гелей (рис. 3–4).

Используемая нами методика позволяет на основе измерения вязкости паст на вибрационном вискозиметре изучать характер набухания почвенных гелей. При этом применяемую трактовку процесса набухания почвенных частиц с позиций физической модели почв, основанную на набухании почвенных минералов и осмотических процессах [1], нельзя назвать безупречной. Для объяснения полученных данных с этих позиций необходимо предположить, что при высушивании и автоклавировании почв в почвенных частицах возникают кристаллизационные контакты, которые снижают их способность к набуханию.

Для высушиваемых почвенных образцов подобное объяснение можно принять, но предста-

вить возникновение кристаллизационных контактов во влажных образцах почв, которые подвергали автоклавированию, достаточно сложно.

Использование коллоидно-химической модели почв снимает противоречия. За счет перехода некоторых частиц в гелях к фиксации в ближнем минимуме агрегации возникают дополнительные гидрофобные связи [7], в результате чего должна снижаться способность гелей к набуханию. При этом для снижения способности гелей и соответственно почв к набуханию не требуется возникновения кристаллизационных контактов.

С этих же позиций перестройкой гелевой матрицы непротиворечиво объясняется замедленность процессов набухания до 3–7 дней. При увеличении содержания воды в почвах гели постепенно увеличивают свой объем за счет поглощения воды. Однако следует учитывать, что процесс вхождения воды в гели требует времени, поэтому даже после добавления воды в почву необходимо время для ее вхождения в гели (набухания гелей). Таким образом, пока почва после добавления воды не пришла к равновесию (гели не расширились и не вобрали в себя воду), свойства паст, приготовленных из почв равновесных и находящихся на пути к равновесию, будут отличаться.

## ВЫВОДЫ

1. Предложен метод, основанный на использовании вибрационной вискозиметрии, позволяющий оценивать в почвенном образце набухание почвенных гелей.
2. На основе применения нового метода выдвинуто предположение, что при высушивании и термообработках почвенных образцов в их гелевой матрице возникают дополнительные гидрофобные связи, которые препятствуют набуханию гелей и самих почвенных частиц.
3. Полученные данные позволяют предположить, что увеличение количества связей в гелях замедляет поглощение ими воды.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Шеин Е.В.* Курс физики почв.: Учебник. — М.: Изд МГУ, 2005. — 432 с.
2. *Тюлин А.Ф.* Органо-минеральные коллоиды в почве, их генезис и значение для корневого питания высших растений. М.: Изд-во АН СССР, 1958. 52 с.
3. *Федотов Г.Н.* Гелевые структуры в почвах. Дисс. докт. биол. наук. М. 2006. 355 с.
4. *Альтшуллер Г.С.* Алгоритм изобретения. М.: Московский рабочий, 1973. 400 с.
5. *Николаева И.В.* Реологические свойства дерново-подзолистых почв и черноземов при различном

- сельскохозяйственном использовании. Дисс. канд. биол. наук. М. 2008. 153 с.
6. *Фролов Ю.Г.* Курс коллоидной химии. Химия. 1982. 463 с.
7. *Потапов Д.И., Шваров А.П., Горепекин И.В., Салимгареева О.А., Федотов Г.Н.* Влияние пробоподготовки почвенных образцов на их теплогидрофизические свойства и аллелотоксичность // Почвоведение. 2022. № 3. С. 315–325.

## STATE OF SOIL GELS UNDER DIFFERENT PREPARATION OF SAMPLES OF SODDY-PODZOLIC SOIL FOR VISCOMETRY

Corresponding Member of the RAS **S. A. Shoba<sup>a</sup>, D. I. Potapov<sup>a</sup>, I. V. Gorepekin<sup>a</sup>, D. A. Ushkova<sup>a</sup>, T. A. Gracheva<sup>a,#</sup>, and G. N. Fedotov<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: tanyadunaeva12@mail.ru*

Since the middle of the 20th century, the presence of films of organomineral gels covering and binding soil particles in soils is well known. It has been shown that the contact of soil with water leads to the absorption of water by gels and their swelling. The change in the properties of gels in soils should manifest itself in a change in the viscosity of soil pastes. It is proposed to use a vibrating viscometer to determine the viscosity of soil pastes. To interpret the data obtained, the physical meaning laid down in Einstein's formula is used. Thanks to this, it became possible to assess the degree of swelling of gels by the amount of water capable of moving independently of soil particles, i.e. not included in the composition of soil gels (free water). It was studied the effect on the degree of swelling of soil gels: 1) the moisture content of soil samples from which soil pastes were prepared; 2) the time elapsed after the addition of water during the preparation of soil samples from which soil pastes were subsequently prepared; 3) sample preparation of soil samples (initial, autoclaved, dried to air-dry and absolutely-dry states and re-moistened), from which soil pastes were then prepared. During the experiments, it was found that 1) with an increase in the moisture content of soil samples, the degree of swelling of soil gels increases; 2) with an increase in the time of interaction of soil samples with water, the degree of swelling of soil gels increases; 3) in pastes prepared from soil samples having the same humidity, but different sample preparation, the degree of swelling of soil gels differs.

**Keywords:** drying of soils, autoclaving of soils, viscometry of soil pastes, free water in soils, gel structures of soils

УДК 616.995.132:569.742.6 551.793.9 (470.5)

## НАХОДКА ЯИЦ ГЕЛЬМИНТОВ *TOXOCARA* В КОПРОЛИТАХ ГИЕНЫ *PACHYROCUTA BREVIROSTRIS* ИЗ ПЛЕЙСТОЦЕНА ПЕЩЕРЫ ТАВРИДА (КРЫМ)

© 2022 г. Т. Н. Сивкова<sup>1</sup>, Д. Р. Хантемиров<sup>2</sup>, Д. О. Гимранов<sup>3,\*</sup>, А. В. Лавров<sup>4</sup>, А. В. Кочнев<sup>2</sup>

Представлено академиком РАН В.В. Малаховым

Поступило 20.01.2022 г.

После доработки 20.02.2022 г.

Принято к публикации 20.02.2022 г.

Исследованы копролиты гиены *Pachycrocuta brevirostris* из нижнего плейстоцена (верхний виллафранк) пещеры Таврида (Крым). Установлено наличие яиц гельминтов в одном из трех образцов. По морфологическим и морфометрическим признакам обнаруженные яйца паразита отнесены к *Toxocara* sp. По-видимому, токсокароз был частым явлением у ископаемых видов гиен. Находка токсокары в копролите *P. brevirostris* из пещеры Таврида является самой древней находкой круглых червей у *P. brevirostris*.

**Ключевые слова:** *Pachycrocuta brevirostris*, гиена, ранний плейстоцен, копролиты, Крым, *Toxocara*, токсокара, паразиты

**DOI:** 10.31857/S2686738922030088

Копролиты древних животных являются уникальным ископаемым материалом, который может отражать те особенности биологии, которые не удается установить на основе изучения костных остатков [1]. Копролиты могут быть ценным источником информации о палеоклимате, так как могут содержать остатки пыльцы и спор древних растений [2]. Копролиты также могут содержать остатки древних паразитов, что дает уникальную возможность получить дополнительную информацию об экологии ископаемого вида [3]. Исследование копролитов также может дать ценную информацию о социальной структуре популяции.

В рыхлых отложениях пещеры Таврида на п-ове Крым, датируемых ранним плейстоценом (поздний Виллафранк, 1.5–1.8 млн. лет), обнаружено большое количество остатков хищных млекопитающих, в том числе гигантской короткомордой гиены *Pachycrocuta brevirostris* (Gervais,

1850) [1, 2]. Гигантская короткомордая гиена была самой крупной в семействе Hyaenidae. Массивные зубы и особо прочное строение их эмали давали им возможность разгрызать кости даже крупных копытных, подобно современным гиеновым. Это позволяло *P. brevirostris* практически полностью утилизировать туши крупных травоядных [6]. В южном коридоре пещеры Таврида были найдены многочисленные зубы, кости стопы, длинные трубчатые кости конечности, позвонки, несколько нижних челюстей *P. brevirostris*, в общей сложности не менее чем от двух десятков особей. Найдено также большое число костей крупных копытных, имеющих характерные погрызы гиен. В южном коридоре слой копролитов достигал 10–20 см на площади около 5 квадратных метров. Очевидно, что гиены использовали пещеру Таврида как логово на протяжении довольно длительного времени.

Работы по изучению копролитов ископаемых и современных гиен немногочисленны [6, 7]. При этом публикации по копролитам *P. brevirostris* единичны. В копролитах *P. brevirostris* из местонахождения Аро (Наго) в Пакистане, возрастом 1.2 млн лет, были найдены яйца нематод рода *Toxocara* [8]. Из местонахождения Коста Сан Джоккомо (Costa San Giosomo) в Италии, датированного 1.5 млн. лет, известны копролиты гиеновых с личинками неидентифицированных нематод. Обсуждаемые копролиты не были ассоциированы с костными остатками гиен, но, скорее всего,

<sup>1</sup> Пермский государственный аграрно-технологический университет, Пермь, Россия

<sup>2</sup> Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

<sup>3</sup> Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, Россия

<sup>4</sup> Палеонтологический институт им. А.А. Борисяка РАН, Москва, Россия

\*e-mail: djulfa250@rambler.ru

принадлежали *P. brevirostris* [9]. Копролиты ископаемой *Crocota crocota* Erxleben, 1777 из местонахождения Западный Рантон (West Runton) в Великобритании сравнивались с фекалиями современных *C. crocota*. Исследованные копролиты оказались на 22–32% крупнее современных [10]. Также в копролитах *C. crocota* из позднплейстоценовых местонахождений Гротто Гуаттари (Grotto Guattari) и Гротта дель Фосселоне (Grotta del Fossellone) в Италии были найдены личинки нематод. Из среднплейстоценового местонахождения Мане-Дрега (Menez-Dregan) во Франции исследованы копролиты *C. crocota*, содержащие яйца *Toxocara canis* Werner, 1782 [9, 11].

Нами исследовано три образца копролитов. Морфологическое описание материала проводили по Жюу-Авантин [12]. Вначале копролиты взвешивали на весах марки Аcom Ltd., модель JW-1, max 600 г,  $d = 0.02$  (Корея), а затем выполняли палеопаразитологическое исследование согласно процедуре, описанной в [13]. Копролиты измельчали в ступке, регидратировали 0.5%-ным раствором фосфата натрия в течение 1 нед при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$  и исследовали комбинированным методом Г.А. Котельникова и В.М. Хренова с раствором нитрата аммония плотностью 1.3 г/мл, а также седиментацией. От каждой пробы было изучено по 80–120 стекол. Просмотр препаратов проводили на микроскопе Meiji с увеличением  $\times 100$  и  $\times 400$  и фотографировали с помощью камеры Vision. Морфометрию яиц проводили при помощи компьютерной программы PhotoM (Россия), при этом измеряли диаметр яиц. Определение паразитов проводили по атласу ВИГИС [14].

Каждый исследуемый образец представлял отдельный сегмент каловой колбаски около трех сантиметров в диаметре. Масса копролитов составила 7.50; 5.77 и 6.58 г. Все образцы имели светло-желтый цвет. Видимых включений кост-

ных фрагментов на поверхности не зафиксировано. Микроскопический анализ показал, что копролиты имеют однородный состав с небольшим включением пылицы растений.

Среди трех исследованных копролитов лишь в одном (образец № 2) обнаружили 4 яйца гельминтов. Яйца имели характерную субсферическую форму, толстую оболочку с нежной ячеистой структурой поверхности, темно-серый цвет и размеры 71.3 мкм. Яйцо – это наиболее защищенная от внешних воздействий стадия развития нематод, позволяющая им не только длительное время сохраняться во внешней среде, но и обеспечивать благополучное осуществление эмбриогенеза, заканчивающееся формированием инвазионной личинки. В зависимости от систематического положения нематод, личинка после развития либо покидает оболочку яйца (стронгиляты, рабдитаты), либо остается внутри (аскариды, некоторые трихоцефалы). Во втором случае оболочка имеет достаточную толщину и прочность, что позволяет инвазионному яйцу оставаться жизнеспособным в течение длительного времени, а в отношении палеоматериала – достаточно хорошо сохранять морфологические характеристики.

Яйца аскаридат чаще по форме бывают округлыми или овальными, с диаметром от 40 до 100 мкм. Их оболочка состоит из трех слоев: наружного – белкового, среднего – глянцевого и внутреннего – волокнистого. У геогельминтов оболочка яйца плотная и чаще имеет одинаковую толщину на всем протяжении. Снаружи она может быть неровной, бугристой (*Ascaris* sp. L, 1758) или ячеистой (*Toxocara* sp. Stiles, 1905). Оболочка яиц токсокар мелкоячеистая, что придает ей некоторое сходство с наперстком, и покрыта клейкой субстанцией, способствующей прикреплению к различным поверхностям [15, 16].

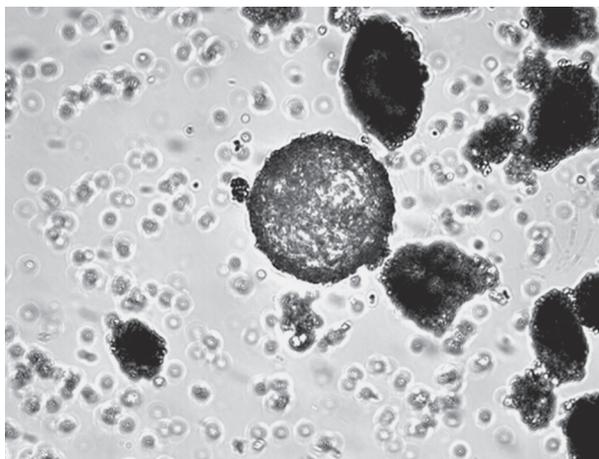


Рис. 1. Фото препарата из образца № 2 копролита *P. brevirostris*. В центре яйцо *Toxocara* sp. (увел.  $\times 400$ ).

Представители Hyaenidae по своей экологии имеют определенное сходство с псовыми хищниками (Canidae). В связи с этим для них характерен сходный спектр эндопаразитов, что было подтверждено паразитологическими исследованиями в отношении пятнистой гиены *C. crocuta* в Кении. При исследовании 17 образцов фекального материала от пятнистой гиены *C. crocuta* в национальном парке Масай Мара (Masai Mara) (Кения) было обнаружено наличие 9 групп паразитов, включая нематод (*Ancylostoma* sp., *Spirometra* sp., *Spirurida*, *Toxocara* sp., *Trichuris* sp.), цестод (Taeniidae, *Mesocestoides* sp., *Dipylidium* sp.) и простейших (*Isospora* sp.) [16]. В Танзании у пятнистых гиен выявлена также инвазия лентецами – *Spirometra theileri*, *Diphyllobothrium* sp., дипилидиями, анкилостоматами и изоспорами [17].

Токсокароз, по всей вероятности, был распространенной инвазией ископаемых видов гиен, что подтверждается данными других исследователей [9, 11]. Яйца токсокар регистрировались в копролитах *P. brevirostris* из местонахождения Аро в Пакистане, возрастом 1.2 млн лет [8], а также у *C. crocuta* из местонахождения Мане-Дрега во Франции, возрастом 0.3–0.5 млн лет [11]. В настоящее же время вид *T. canis* регистрируется у африканских гиен [18, 19]. Таким образом, находка яиц *Toxocara* sp. из пещеры Таврида является самой древней находкой круглых червей у гигантской короткомордой гиены.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chin K. Analyses of coprolites produced by carnivorous vertebrates // The Paleontological Society Papers. 2002. V. 8. P. 43–50.
2. Scott L., Fernández-Jalvo Y., Carrión J., Brink J. Preservation and interpretation of pollen in hyaena coprolites: taphonomic observations from Spain and southern Africa // Palaeont. afr. 2003. V. 39. P. 83–91. ISSN 0078-8554.
3. Jouy-Avantin F., Combes C., Miskovsky J.C., Moné H. Helminth eggs in animal coprolites from a Middle Pleistocene site in Europe // Journal of Parasitology. 1999. V. 85. P. 376–379.
4. Лопатин А.В., Вислобокова И.А., Лавров А.В., и др. Пещера Таврида – новое местонахождение раннеплейстоценовых позвоночных в Крыму // Доклады Академии наук. 2019. Т. 485. № 3. С. 381–385.
5. Лавров А.В., Гимранов Д.О., Старцев Д.Б., Лопатин А.В. Гигантская гиена *Pachycrocuta brevirostris* (Hyaenidae, Carnivora) из нижнего плейстоцена пещеры Таврида, Крым // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2021. Т. 496. С. 10–14.
6. Turner A., Anton M. The giant hyaena, *Pachycrocuta brevirostris* (mammalia, carnivora, hyaenidae) // Geobios. 1996. V. 29. P. 455–468.
7. Horwitz L., Goldberg P. A study of Pleistocene and Holocene hyena coprolites // Journal of Archaeological Science. 1989. V. 16. P. 71–94.
8. Perri A.R., Heinrich S., Gur-Arieh S., Saunders J.J. Earliest Evidence of *Toxocara* in a 1.2-million-year-old Extinct Hyena (*Pachycrocuta brevirostris*) Coprolite from NW Pakistan // J Parasitol. 2017. V. 103. № 1. P. 138–141.
9. Ferreira L.F., Araújo A., Duarte A.N. Nematode Larvae in Fossilized Animal Coprolites from Lower and Middle Pleistocene Sites, Central Italy // The Journal of Parasitology. 1993. V. 79. №. 3. P. 440–442.
10. Larkin N.R., Alexander J., Lewis M.D. Using Experimental Studies of Recent Faecal Material to Examine Hyaena Coprolites from the West Runton Freshwater Bed, Norfolk, U.K. // Journal of Archaeological Science. 2000. V. 27. P. 19–31.
11. Bouchet F., Araujo A., Harter S., et al. *Toxocara canis* (Werner, 1782) Eggs in the Pleistocene Site of Menez-Dregan, France (300,000-500,000 Years Before Present) // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2003. V. 98. P. 137–139.
12. Jouy-Avantin F. et al. A standardized method for the description and the study of coprolites // Journal of Archaeological Science. 2003. V. 30. № 3. P. 367–372.
13. Beltrame M.O., Sardella N.H., Fugassa M.H., Barbarena R. A paleoparasitological analysis of rodent coprolites from the Cueva Huenul 1 archaeological site in Patagonia (Argentina) // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2012. V. 107. № 5. P. 604–612.
14. Черепанов А.А., Москвин А.С., Котельников Г.А., Хренов В.М. Атлас. Дифференциальная диагностика гельминтозов по морфологической структуре яиц и личинок возбудителей. М.: Россельхозакадемия, 2002. 85 с.
15. Шуляк Б.Ф., Архипов И. А. Нематодозы собак: (зоонозы и зооантропонозы). М.: КонсоМед, 2010. 495 с.
16. Определитель паразитических нематод. М.-Л.: Акад. наук СССР, 1954. 2450 с.
17. Engh A.L. et al. Coprologic survey of parasites of spotted hyenas (*Crocuta crocuta*) in the Masai Mara National Reserve, Kenya // J Wildl Dis. 2003. V. 39. № 5. P. 224–227.
18. Eom K.S. et al. Identity of *Spirometra theileri* from a Leopard (*Panthera pardus*) and Spotted Hyena (*Crocuta crocuta*) in Tanzania // Parasitol. 2019. V. 57 № 6. P. 639–645.
19. Мозговой А.А. Аскариды животных и человека и вызываемые ими заболевания. Кн. 2. М.: АН СССР, 1953. 616 с.
20. Heitlinger E., Ferreira S.C.M., Thierer D., Hofer H., East M.L. The Intestinal Eukaryotic and Bacterial Biome of Spotted Hyenas: The Impact of Social Status and Age on Diversity and Composition // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2017. V. 7.

**EVIDENCE OF *TOXOCARA* EGGS IN *PACHYCROCUTA BREVIROSTRIS*  
(GERVAIS, 1850) COPROLITES FROM THE PLEISTOCENE  
OF TAURIDA CAVE (CRIMEA)**

**T. N. Sivkova, D. R. Khantemirov<sup>b</sup>, D. O. Gimranov<sup>#</sup>, A. V. Lavrov<sup>d</sup>, and A. V. Kochnev<sup>b</sup>**

<sup>a</sup> Perm State Agro-Technological University named after Academician D.N. Pryanishnikov, Perm, Russian Federation

<sup>b</sup> Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

<sup>c</sup> Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

<sup>d</sup> Borissiak Paleontological Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: djulfa250@rambler.ru

Presented by Academician of the RAS V.V. Malakhov

Coprolites of the hyena *Pachycrocuta brevirostris* from the Lower Pleistocene (Upper Villafranchian) of Taurida Cave (Crimea) were studied. One of the three hyena coprolites contained eggs of a helminth. These eggs were attributed to *Toxocara* sp. based on size and morphology. Toxocariasis was evidently a very common infestation among extinct hyena species. The find of toxocara in *P. brevirostris* coprolite from the Taurida Cave is the earliest evidence of roundworm infestation in *P. brevirostris*.

*Keywords:* *Pachycrocuta brevirostris*, hyena, Early Pleistocene, coprolites, Crimea, *Toxocara*, parasites